

Herstellung und Anwendung von liposomalen Carriersystemen für die inhalative Applikation von Iloprost

UTE RÜSCH

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Pferde, Innere
Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: PD Dr. med. vet. Kerstin Fey

und

dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen

Medizinische Klinik und Poliklinik II

Betreuer: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Herstellung und Anwendung von liposomalen Carriersystemen für die inhalative Applikation von Iloprost

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Ute Rüsç

Tierärztin aus Wermelskirchen

Gießen 2010

**Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: **Prof. Dr. M. Kramer**

Gutachter/in: **PD Dr. K. Fey**
Prof. Dr. W. Seeger

Tag der Disputation: **19.10.2010**

**Für meine Familie,
für Hermann, Haiko, Giotto und Otty.**

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1. EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
<u>2. STAND DER UNTERSUCHUNGEN ZU BEGINN DER ARBEIT</u>	<u>2</u>
2.1 DIE PULMONAL-ARTERIELLE HYPERTONIE	2
2.1.1 DIAGNOSTISCHE KLASSIFIKATION DER NYHA- STADIEN	2
2.1.2 EPIDEMIOLOGIE	3
2.1.3 PATHOMECHANISMUS DER PULMONALEN HYPERTONIE	3
2.1.4 THERAPIE.....	4
Allgemeine Maßnahmen.....	4
Medikamentöse Therapien.....	5
2.2 LIPOSOMEN	7
2.2.1 DEFINITION UND EIGENSCHAFTEN	7
2.2.2 KLASSIFIKATION.....	9
2.2.3 ANWENDUNG	9
2.2.4 HERSTELLUNGSMETHODEN.....	10
Filmmethode	11
Extrusion.....	12
2.2.5 CHARAKTERISIERUNG.....	12
Größenmessung	12
Verkapselungseffizienz (VE).....	13
Stabilität.....	13
2.3 VORGEHEN UND ZIELSETZUNG	14
<u>3. MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>15</u>
3.1 DAS ISOLIERTE HERZ- LUNGEN- MODELL BEIM KANINCHEN	15
3.1.1 VERSUCHSTIERE	15

3.1.2	INITIALE NARKOSE UND ANTIKOAGULATION	15
3.1.3	INTUBATION.....	16
3.1.4	BEATMUNG.....	16
3.1.5	LAPAROTOMIE UND THORAKOTOMIE.....	17
3.1.6	INTEGRATION DER LUNGE IN DAS MESSSYSTEM.....	17
3.1.7	PERFUSIONSKREISLAUF.....	18
3.1.8	REGISTRIERUNG DES LUNGENGEWICHTES	19
3.1.9	EIGNUNG DER LUNGENPRÄPARATE FÜR DIE VERSUCHE	20
3.2	HERSTELLEN DER LÖSUNGEN	20
3.2.1	ACETATPUFFER.....	20
3.2.2	CARBOXYFLUORESCEINLÖSUNG	21
3.2.3	ILOPROSTLÖSUNG	21
3.2.4	PHOSPHATGEPUFFERTE SALZLÖSUNG OHNE Ca^{2+} UND Mg^{2+} (PBS)	21
3.2.5	TRITON [®] -X-100– LÖSUNG.....	22
3.2.6	EICHREIHENLÖSUNGEN FÜR DEN FLUORESZENZREADER.....	22
3.3	RADIOAKTIVE CHARAKTERISIERUNG DES ULTRASCHALL- UND DES PIEZOELEKTRISCHEN VERNEBLERS	23
3.3.1	DER ULTRASCHALLVERNEBLER.....	24
3.3.2	DER PIEZOELEKTRISCHE VERNEBLER	24
3.4	HERSTELLUNG VON LIPOSOMEN.....	24
3.4.1	FILMMETHODE	25
	Hydrierung des Lipidfilms und Substanzzugabe	26
	Extrusion.....	26
	Zentrifugation	27
3.4.2	BESTIMMUNG VON GRÖÖE, VERKAPSELUNGSEFFIZIENZ UND STABILITÄT ...	27
	Größenmessung der carboxyfluorescein- bzw. iloprosthaltigen Liposomen- Dispersionen	28
	Verkapselungseffizienz.....	28
	Stabilität der carboxyfluoresceinhaltigen Liposomen gegenüber der Verneblung	29
3.4.3	VERNEBLUNG AM ISOLIERTEN LUNGENMODELL.....	30
	Verneblung von freiem und in Liposomen eingekapseltem Carboxyfluorescein..	30

Verneblung von freiem und in Liposomen eingekapseltem Iloprost.....	30
3.5 STATISTISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	31
<u>4. ERGEBNISSE</u>	<u>32</u>
4.1 RADIOAKTIVE CHARAKTERISIERUNG DER VERNEBLER	32
4.2 VERSUCHE MIT CARBOXYFLUORESCEIN.....	33
4.2.1 CHARAKTERISIERUNG DER CARBOXYFLUORESCEINHALTIGEN LIPOSOMEN .	34
4.2.2 KORREKTURRECHNUNG	36
4.2.3 VERNEBLUNG DER CARBOXYFLUORESCEINHALTIGEN LIPOSOMEN IM VERGLEICH ZU UNVERKAPSELTEM CARBOXYFLUORESCEIN	37
4.3 VERSUCHE MIT ILOPROST	39
4.3.1 PAP NACH INHALATIVER APPLIKATION VON FREIEM ILOPROST AM MODELL DER ISOLIERTEN KANINCHENLUNGE	39
4.3.2 PAP NACH INHALATIVER APPLIKATION VON VERKAPSELTEM ILOPROST IM VERGLEICH ZU UNVERKAPSELTEM ILOPROST	40
<u>5. DISKUSSION</u>	<u>43</u>
5.1 KRITISCHE BETRACHTUNG DER METHODIK	43
5.1.1 DAS ISOLIERTE HERZ-LUNGEN-MODELL VON KANINCHEN	43
5.1.2 VERWENDUNG VON CARBOXYFLUORESCEIN	44
5.1.3 VERWENDUNG VON ILOPROST	44
5.1.4 PULMONALE HYPERTONIE DURCH U 46619	45
5.1.5 HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LIPOSOMEN	45
5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	46
5.2.1 RADIOAKTIVE VERSUCHE MIT ZWEI VERNEBLUNGSSYSTEMEN	47
5.2.2 VERSUCHE MIT DEM FARBSTOFF CARBOXYFLUORESCEIN	48
Charakterisierung der farbstoffhaltigen Liposomen	48
Verneblung von Carboxyfluorescein in das isolierte Herz-Lungen-Modell	50
Verneblung der farbstoffhaltigen Liposomen	51

5.2.3 VERSUCHE MIT ILOPROST	51
Verneblung von freiem Iloprost.....	52
Verneblung von iloprosthaltigen Liposomen	53
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>54</u>
<u>7. SUMMARY.....</u>	<u>56</u>
<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>58</u>
<u>ANHANG.....</u>	<u>65</u>
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>71</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS.....</u>	<u>72</u>
TABELLEN IM TEXT.....	72
TABELLEN IM ANHANG	72
<u>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....</u>	<u>73</u>

1. Einleitung

Gegenstand der Arbeit ist die Herstellung und Anwendung von liposomalen Carriersystemen für die inhalative Applikation des vasoaktiven Wirkstoffs Iloprost, um eine optimierte Therapiemöglichkeit für Menschen zu schaffen, die an pulmonaler Hypertonie (PH) erkrankt sind.

Die pulmonale Hypertonie ist eine seltene, jedoch schwere und lebensbedrohliche Erkrankung des Menschen, die gekennzeichnet ist durch einen progredienten Verlauf [SIMONNEAU et al. 2004]. Charakteristische Merkmale der Erkrankung sind der pathologisch erhöhte pulmonal-arterielle Druck sowie die progressive Obliteration des pulmonalen Gefäßbettes, die zu fortschreitendem Rechtsherzversagen und zum Tod führen [D'ALONZO et al. 1991]. Die Therapie der pulmonalen Hypertonie beinhaltet neben allgemeinen Maßnahmen wie der Vermeidung von Belastungen, die zu Dyspnoe führen, eine gezielte medikamentöse Versorgung. Die zugelassene inhalative Applikation von Iloprost ist eine der wichtigsten Optionen zur Behandlung von pulmonaler Hypertonie [OLSCHEWSKI et al. 2002]. Dadurch wird eine intensive, selektive pulmonale Vasodilatation erreicht, die 30 bis 90 Minuten andauern kann. Iloprost zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit aus. Der Anwendungsnachteil besteht darin, dass aufgrund der geringen Wirkdauer die Patienten häufig inhalieren müssen (6 bis 12 Inhalationseinheiten/Tag) und Therapielücken in der Nacht entstehen [OLSCHEWSKI 2006]. Daher soll in der vorliegenden Arbeit durch die Einkapselung von Iloprost in Liposomen eine controlled release Formulierung entwickelt werden. Das inhalativ verabreichte, verkapselte Iloprost soll verzögert aus den Liposomen freigesetzt werden. Damit würde die Applikationshäufigkeit sinken, Therapielücken könnten geschlossen werden und die Lebensqualität der Patienten würde sich verbessern.

Vorbereitend wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig ein Ultraschall- und ein piezoelektrischer Vernebler radioaktiv charakterisiert. Gesamtdeposition,

Exhalation und Depositionsfraction wurden untersucht und der besser geeignete Vernebler für die Untersuchungen mit der Modelldroge Carboxyfluorescein (CF) weiter verwendet. Mit Hilfe von Carboxyfluorescein wurden zwei verschiedene Liposomendispersionen bezüglich Größe, Verkapselungseffizienz, Stabilität und Verhalten bei Verneblung in der isolierten Kaninchenlunge untersucht. Die Versuche mit Iloprost wurden mit der geeigneteren Liposomendispersion durchgeführt. Ziel war es zu untersuchen, ob in Liposomen eingekapseltes Iloprost eine länger andauernde pulmonal-arterielle Drucksenkung im Tiermodell erzeugen kann als der freie Wirkstoff.

2. Stand der Untersuchungen zu Beginn der Arbeit

2.1 Die pulmonal-arterielle Hypertonie

Eine pulmonale Hypertonie besteht laut European Society of Cardiology (ESC), wenn der pulmonal-arterielle Mitteldruck > 25 mmHg in Ruhe oder > 30 mmHg bei Belastung erreicht [GALIÈ et al. 2004].

2.1.1 Diagnostische Klassifikation der NYHA-Stadien

Die diagnostische Klassifikation und Einteilung der von pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH) betroffenen Patienten in die „New York Heart Association (NYHA-) Stadien“ sind für die optimale Therapieform wichtig. Auf der PAH-Weltkonferenz 2003 in Venedig wurde die derzeit noch gültige Klassifikation der pulmonalen Hypertonie beschlossen [GALIÈ et al. 2004; SIMONNEAU et al. 2004]. Die Arbeitsgemeinschaft „Pulmonale Hypertonie“ (AGPHT) erarbeitete einen Therapiealgorithmus [OLSCHEWSKI 2006] zur medikamentösen Therapie der pulmonalen Hypertonie. Die Patienten werden dabei in NYHA-Stadien von I bis IV entsprechend ihrer körperlichen Verfassung und Leistungsfähigkeit eingeteilt. Im Stadium IV ist der Zustand der Patienten sehr schlecht. Inhalatives

Iloprost ist in Europa bereits in der Indikation PAH, NYHA III zugelassen [OLSCHEWSKI et al. 2007].

2.1.2 Epidemiologie

Die pulmonal-arterielle Hypertonie ist eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von durchschnittlich ein bis zwei Fällen pro Million Einwohner und Jahr. Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt ohne spezielle Therapie ca. drei Jahre. Epidemiologische und demographische Studien zeigen eine gesicherte Korrelation zwischen weiblichem Geschlecht und Häufigkeit des Auftretens der PAH. Frauen erkranken bei einem Verhältnis von 1,7-3,5:1 häufiger als Männer. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt 36 Jahre [LOYD et al. 1984; RICH et al. 1987; D'ALONZO et al. 1991; RUBIN 1993; LANGLEBEN 1994; GAINE AND RUBIN 1998].

2.1.3 Pathomechanismus der pulmonalen Hypertonie

Die charakteristischen Merkmale der pulmonalen Hypertonie sind der pathologisch erhöhte pulmonal-arterielle Druck und die progressive Obliteration des pulmonalen Gefäßbettes, die zu progredientem Rechtsherzversagen und zum Tod führen [D'ALONZO et al. 1991]. Zu Beginn der Erkrankung entwickeln sich Endothelläsionen aus bislang ungeklärter Ursache, die kaskadenartig weitere pathologische Veränderungen bewirken können [GIAID AND SALEH 1995; YUAN et al. 1998]. Das pulmonale vaskuläre Remodelling spielt eine zentrale Rolle. Involviert sind die drei Gefäßwand-Schichten: Intima, Media und Adventitia. Hypertrophie, Hyperplasie und vermehrte Deposition von extrazellulären Matrix-Komponenten rufen pathologische Veränderungen der Gefäßwand-Architektur hervor. Intima- und Media-Verdickungen führen zu einer Verengung des Gefäßlumens, zu erhöhtem Widerstand und letztendlich zum Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes [GIAID et al. 1993; GAINE AND RUBIN 1998; RUBIN 2002]. Als Folge der Adventitia-Verdickung sinkt die

Compliance und die Dehnbarkeit der Gefäße ist vermindert. Dies hat ebenfalls eine Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes zur Folge [TUDER 2001]. Die Synthese von vasodilatierenden Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin ist wegen der reduzierten Expression von endothelialer Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOs) und Prostazyklinsynthetase vermindert. Endothelin, ein potenter Vasokonstriktor, ist in der Lunge von Patienten mit pulmonaler Hypertonie überexprimiert [GIAID et al. 1993; CHRISTMAN et al. 1992]. Gesteigerte Vasokonstriktion und beeinträchtigte Vasodilatation führen zu endothelialer Zellschädigung und Dysfunktion [CHEN AND OPARIL 2000].

2.1.4 Therapie

Die Therapie der pulmonalen Hypertonie wird im Folgenden in allgemeine Maßnahmen sowie die medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten aufgegliedert.

Allgemeine Maßnahmen

Bei allen Formen der pulmonalen Hypertonie ist körperliche Schonung ausgesprochen wichtig. Belastungen, die zu Dyspnoe und Schwächeanfällen führen, sind strikt zu vermeiden. Dennoch ist gezieltes körperliches Training wichtig. Dies konnte durch eine randomisierte Studie nachgewiesen werden [MERELES et al. 2006]. Prophylaxe und sofortige Therapie bei Hypoxämie, Überwässerung und Infekten sind notwendig. Vor allem für die idiopathische und familiäre Form der pulmonalen Hypertonie wird von der Arbeitsgemeinschaft Pulmonale Hypertonie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie und der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz und Kreislaufforschung (AGPHT) eine lebenslange Antikoagulation empfohlen, da Thrombosen im pulmonalen Gefäßsystem bei dieser Erkrankung zu den häufig erhobenen pathologischen Befunden gehören [FUSTER et al. 1984; GAINES AND RUBIN 1998]. Flugreisen

stellen für die Patienten ebenso ein Risiko dar wie der Aufenthalt in Höhenlagen oberhalb von 1400 m über NN [OLSCHEWSKI et al. 2007].

Medikamentöse Therapien

Die Arbeitsgemeinschaft Pulmonale Hypertonie schlägt einen Therapiealgorithmus vor, der abhängig von diagnostischer Klassifikation und der NYHA-Klasse der Patienten folgende medikamentöse Behandlungsstrategien vorsieht [BARST et al. 2004; OLSCHESKI et al. 2007]:

Patienten mit einem NYHA-Stadium I oder II, die bei einer Herzkatheteruntersuchung mit einer starken, akuten Vasodilatation auf Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostanoiden oder Adenosin reagieren, können mit hochdosierten Calciumantagonisten (HDCAA) therapiert werden [RICH et al. 1992; SITBON et al. 2005]. Langfristig gesehen profitieren davon 10-15% der Patienten, die an der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie (IPAH) bzw. an der familiär pulmonal-arteriellen Hypertonie (FPAH) erkrankt sind. Kann unter dieser Therapie das NYHA-Stadium I-II erhalten bleiben, ist keine zusätzliche Therapie erforderlich [OLSCHEWSKI et al. 2007].

Patienten mit NYHA-Stadium III oder IV können mit HDCAA, mit Endothelinrezeptorantagonisten (ERA), mit Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (PDE5I) oder mit Prostanoiden therapiert werden. Endothelin-1 wird bei der pulmonalen Hypertonie überexprimiert und führt zu pulmonal proliferativen und vasokonstriktischen Effekten. Der Endothelinrezeptorantagonist Bosentan ist für die orale Applikation verfügbar [BEHR et al. 2005; KIRCHENGAST AND LUZ 2005]. Das Medikament ist in Europa nach zwei positiven kontrollierten randomisierten Studien (RCT) von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie im funktionellen Stadium NYHA III zugelassen [RUBIN et al. 2002]. Phosphodiesterase-5-Inhibitoren steigern die Wirkung von endogenem Stickstoffmonoxid (NO), indem sie den Abbau des Botenstoffs cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) hemmen. Dies führt zur pulmonalen Vasodilatation und zur Hemmung der Proliferation der

glatten Gefäßmuskulatur. Sildenafil wurde als Phosphodiesterase-5-Inhibitor in den USA und in Europa zur Therapie von pulmonaler Hypertonie zugelassen [MICHELAKIS et al. 2002; SASTRY et al. 2004; GALIÈ et al. 2005].

Iloprost ist ein Analogon des endogenen Prostazyklins. Seine Potenz in Bezug auf pulmonale Vasodilatation entspricht der von Prostazyklin. Von Vorteil ist jedoch, dass der Effekt länger andauert [GALIÈ et al. 2003; OLSCHESKI et al. 2007]. Prostazyklin bewirkt an der glatten Gefäßmuskulatur eine durch G-Protein vermittelte Aktivierung der Adenylatcyclase. Dies führt zur Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches durch Phosphodiesterasen gespalten wird. cAMP führt in der glatten Muskelzelle zu einer Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration und somit zur Vasodilatation. Iloprost ist neben der intravenösen auch zur inhalativen Therapie zugelassen und wird in der Literatur als wichtiges Medikament zur Behandlung von pulmonaler Hypertonie hervorgehoben [OLSCHESKI et al. 2002; GESSLER et al. 2008]. Der Patient inhaliert sechs bis zwölf Mal pro Tag mit einer Inhalationsdauer zwischen vier und zehn Minuten. Diese Therapie ist auch bei dekompensierten Patienten erfolgreich anwendbar [OLSCHESKI et al. 2000]. Inhaliertes Iloprost (Halbwertszeit 20 bis 30 min) vermindert den pulmonal-arteriellen Druck effektiver als Stickstoffmonoxid. Es bewirkt eine intensive, selektive pulmonale Vasodilatation, die 30 bis 90 Minuten andauern kann [HOEPER et al. 2002; OLSCHESKI et al. 2007].

Verbessert eine Therapieform im NYHA-Stadium III oder IV die Lebensqualität eines an pulmonaler Hypertonie erkrankten Patienten nicht oder mit zu geringem Erfolg, kann ein Wechsel von einem Prostanoid auf Endothelinrezeptorantagonisten oder Phosphodiesterase-5-Inhibitoren und umgekehrt erfolgen. Auch ein Wechsel innerhalb der Prostanoiden bzw. eine Kombinationstherapie kann sinnvoll sein [BEHR et al. 2005; OLSCHESKI et al. 2007; KÄHLER 2009].

2.2 Liposomen

Im Folgenden werden zunächst Liposomen definiert sowie ihre Struktur, Eigenschaften und Klassifikation beschrieben. Dann wird ein Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten, die Herstellungsmethoden und die Charakterisierung von Liposomen gegeben.

2.2.1 Definition und Eigenschaften

BANGHAM et al. untersuchten in den 1960er Jahren das Verhalten von Phospholipiden (PL) in wässrigen Medien und legten so den Grundstein für die Entdeckung der Liposomen [BANGHAM 1963; BANGHAM et al. 1964; BANGHAM et al. 1965; PAPAHAJOPOULOS AND BANGHAM 1966; BANGHAM 1972]. Liposomen (griech. *liposoma*: Fettkörperchen) sind kugelförmige Vesikel. Darin befindet sich eine wässrige Phase, die vollständig von einer oder mehreren Lipiddoppelschichten (Bilayer) eingeschlossen ist [HUANG 1969].

Zur Herstellung von Liposomen werden Phospholipide, Cholesterol und Glycolipide verwendet [SCHUBERT 1998]. Als Basisbausteine der Lipiddoppelschichten kommen Phospholipide zum Einsatz. Zur Herstellung geeignet sind natürliche (Lecithin, Phosphatidylcholin), modifizierte natürliche (hydriertes Phosphatidylcholin), halbsynthetische (veränderte Alkylketten) und vollsynthetische Phospholipide. Strukturell bestehen Phospholipide aus der hydrophilen Kopfgruppe und einem lipophilen Rest. Ein Phosphorsäurediester, verknüpft mit einer Hydroxylgruppe des Glycerols und mit Cholin, Ethanolamin, Serin oder einem weiteren Glycerolmolekül, bildet die hydrophile Kopfgruppe. Der lipophile Rest eines Phospholipids setzt sich zusammen aus zwei mit den restlichen Hydroxylgruppen des Glycerols veresterten Fettsäuren, die 12 bis 24 Kohlenstoffatome aufweisen [NEW 1990].

In Liposomen lassen sich hydrophile und lipophile Arzneistoffe einkapseln. Die hydrophilen Stoffe befinden sich sowohl im wässrigen Innenraum als auch in den

Bilayern, während die lipophilen Stoffe innerhalb der Bilayer eingekapselt werden. Bereits in den 1970er Jahren wurde das Potenzial der Liposomen als Arzneistoffträger erkannt [SESSA AND WEISSMANN 1970; GREGORIADIS AND RYMAN 1971; GREGORIADIS 1973; GREGORIADIS AND BUCKLAND 1973; GREGORIADIS 1976].

Die kugeligen Partikel haben einen Durchmesser zwischen etwa 20 nm und mehreren hundert Mikrometern. Zusammen mit der wässrigen Phase bilden sie eine Dispersion. Liposomen entstehen durch spontane Selbstassoziation von amphiphilen Phospholipiden, welche aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem lipophilen Rest bestehen, im wässrigen Milieu. Auslöser für diesen Prozess sind die thermodynamischen Eigenschaften und die Molekülgeometrie der Phospholipide [ISRAELACHVILI et al. 1977]. Phospholipide und damit auch die Membranen der Liposomen nehmen bei unterschiedlichen Temperaturen verschiedene Phasenzustände ein. Die Lamellen einer Lipiddoppelschicht können entweder als geordnete Gelstruktur oder als flüssig-kristalline Phase vorliegen. Die Fluidität der Bilayer hängt von der sogenannten Phasenübergangstemperatur (T_c) ab, bei der Gelphase und flüssig-kristalliner Zustand koexistieren. Bei Überschreitung der Phasenübergangstemperatur findet der Übergang von der Gelform, bei der die Fettsäurereste des Amphiphils in einem quasikristallinen, zweidimensionalen Gitterzustand mit nur geringer Beweglichkeit vorliegen, in eine flüssig-kristalline Struktur statt, bei der die Acylketten wesentlich beweglicher sind. Die Phasenübergangstemperatur der einzelnen Lipide hängt von der Kopfgruppe, der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Fettsäurereste ab. Sie kann mit thermoanalytischen Methoden bestimmt werden und liegt zwischen -20°C und 60°C. In der flüssig-kristallinen Phase nimmt die Beweglichkeit der lipophilen Reste zu. Sie können dadurch ihren Platz innerhalb der Lipidschicht mit anderen Molekülen tauschen, die Lipidschicht jedoch nicht verlassen [NEW 1990; SZOKA und PAPAHA DJOPOULOS 1980].

2.2.2 Klassifikation

Die Klassifikation der Liposomen erfolgt aufgrund ihrer physikalischen Struktur. Es wird eine Unterteilung in Bezug auf Größe (small, large und giant) und Lamellenzahl (unilamellar, oligolamellar und multilamellar) vorgenommen. Unilamellare Vesikel verfügen über eine Lamelle. Oligolamellare Vesikel bestehen aus zwei bis drei Lamellen und multilamellare Liposomen weisen über drei Lamellen auf [NEW 1990].

Small unilamellar vesicles (SUV)

In der Literatur sind Größenangaben von 25 nm [SHARMA et al. 1977; NEW 1990], 20-50 nm [WEINSTEIN 1984] und 20-100 nm [LASIC et al. 1992] beschrieben.

Large unilamellar vesicles (LUV)

Diese Liposomen haben Diameter in einer Größenordnung von bis zu 1 µm [NEW 1990].

Multilamellar vesicles (MLV)

Es handelt sich um multilamellare Vesikel, die sich in einem weit gesteckten Größenbereich zwischen 100 nm und 10 µm bewegen [NEW 1990].

Oligolamellar vesicles (OLV)

In der Literatur finden sich Größenangaben von 100 nm bis 1 µm [NEW 1990].

Giant unilamellar vesicles (GUV)

GUV sind Liposomen, die von über 1 µm bis zu 50 µm [TORCHILIN AND WEISSIG 2003] groß sein können.

2.2.3 Anwendung

Liposomen finden Anwendung als Wirkstoffträger zur parenteralen Applikation. Arzneimittelbeispiele sind AmBisome® (zur Therapie von systemischen Mykosen mit dem Wirkstoff Amphotericin B), Caelyx®, Doxil® und Myocet® (Zytostatika

mit dem Wirkstoff Doxorubicin), DaunoXome® (Anthrazyklin-Antibiotikum mit antineoplastischer Wirkung mit dem Wirkstoff Daunorubicin), DepoCyte® (zur Therapie von systemischen Mykosen mit dem Wirkstoff Cytarabin). Zugelassen zur topischen Applikation sind u.a. Heparin PUR/-forte® (Adjuvans bei akuten Schwellungszuständen nach stumpfen Traumen und als Heparin forte zusätzlich bei oberflächlichen Venenentzündungen mit dem Wirkstoff Heparin), Pevaryl-Lipogel® (Antimykotikum mit dem Wirkstoff Econazol) sowie Sanosop® (zur Behandlung von erblich bedingtem Haarausfall mit dem Wirkstoff Minoxidil). Desweiteren kommen Liposomen in Impfstoffen zum Einsatz. Beispiele sind Epaxal® (Wirkstoff Hepatitis A Virusantigen), HAVpur® (Wirkstoff Hepatitis A Impfstoff inaktiviert) und Invivac® (Wirkstoffe sind Hämagglutinin und Neuraminidase verschiedener Stämme). Liposomen werden zudem für den Transfer von Nukleinsäuren verwendet.

2.2.4 Herstellungsmethoden

Der Ausgangspunkt der Liposomenherstellung ist die spontane Bildung von Phospholipid-Bilayern als Resultat von passiven Interaktionen zwischen Phospholipiden und wässrigem Medium. Die unterschiedlichen Herstellungsverfahren und die Lipidzusammensetzung nehmen Einfluss auf Größe und Lamellarität der Liposomen [NEW 1990].

Liposomen können spontan oder durch Verwendung von organischen Lösungsmitteln, durch mechanische Verfahren oder durch die Verwendung von Detergenzien entstehen.

Die spontane Liposomenentstehung erfolgt durch Hydratisierung von trockenen Lipiden. Dadurch entstehen *multilamellar vesicles* (MLV) oder *oligolamellar vesicles* (OLV). Bei der Verwendung von organischen Lösungsmitteln werden Lipide üblicherweise in Methanol oder Chloroform gelöst. Das Lösungsmittel wird durch Vakuumtrocknung entzogen und ein homogener Lipidfilm entsteht (Filmmethode). Dieser wird mit der Substanz hydratisiert, die in die Liposomen eingekapselt werden soll, also entweder mit Puffer- oder mit Wirkstofflösung.

Dadurch entstehen *multilamellar vesicles* (MLV) oder *oligolamellar vesicles* (OLV). Mit Hilfe mechanischer Verfahren können bereits vorhandene Liposomen weiter bearbeitet werden. Durch Extrusion, Hochdruckhomogenisation oder Ultraschall wirkt Energie in Form von Scherkräften, Drucksprüngen oder Schall auf die Liposomen ein. Dadurch werden die Lamellen der *multilamellar vesicles* (MLV) zerstört und es entstehen neue Vesikel, die *large unilamellar* (LUV), *small unilamellar* (SUV) oder *oligolamellar* (OLV) sein können.

Andererseits können Liposomen durch die Zugabe von Detergenzien (z.B. Natriumcholat oder n-Octyl- β -D-glycopyranosid) entstehen. Es bilden sich zunächst Mischmizellen. Durch anschließenden Detergenzentzug in Form von Dilution, Dialyse, Gelfiltration oder Adsorption entstehen LUVs oder SUVs [TORCHILIN AND WEISSIG 2003].

Im Folgenden werden die Methoden beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden.

Filmmethode

Durch die Filmmethode, die erstmals im Jahr 1965 in der Literatur beschrieben wurde, werden multilamellare Liposomen hergestellt [BANGHAM et al. 1965]. Lipide, die in Pulverform vorliegen, werden in einen Rundkolben eingewogen und mit Hilfe eines organischen Lösungsmittelgemisches durch Schwenken gelöst. Das Lösungsmittelgemisch wird den Lipiden mit einem Rotationsevaporator wieder entzogen. Ein homogener, transparenter Lipidfilm entsteht am Kolbenboden [BANGHAM et al. 1965; TORCHILIN AND WEISSIG 2003]. Es folgt die Hydratisierung des getrockneten Lipidfilms mit wässriger Lösung, in der die Substanzen, die eingekapselt werden sollen, in bestimmter Konzentration enthalten sind. Eine Liposomendispersion entsteht spontan durch Selbstassoziation [BANGHAM et al. 1965]. Die hergestellten Liposomen sind multilamellar und unterschiedlich groß. Die Weiterbehandlung der Dispersion ist zur Vereinheitlichung von Größe und Lamellenart in der Liposomenpopulation notwendig. Dies erfolgt durch Extrusion.

Extrusion

Bei der Extrusion werden die Liposomen in einer Apparatur (zum Beispiel Hamilton®-Spritzen-System und LiposoFast®-Apparatur) durch eine porenhaltige Polycarbonatmembran gepresst. Üblicherweise werden Porendurchmesser von 80 bis 800 nm eingesetzt [OLSON et al. 1979; MAYER et al. 1986; MACDONALD et al. 1991]. Es entstehen uni- oder oligolamellare Liposomen von homogener Größenverteilung in Abhängigkeit vom Porendurchmesser des eingesetzten Filters und der Anzahl der Extrusionsschritte, d.h. der Passagen der Liposomendispersion durch die Filtermembran. Die Anzahl der Lamellen wird durch die Polycarbonatmembran reduziert [NEW 1990].

2.2.5 Charakterisierung

Die hergestellten Liposomen werden durch Größe, Verkapselungseffizienz und Stabilität gegenüber der Verneblung charakterisiert.

Größenmessung

Die Größenmessung der Liposomen kann durch Laserdiffraktometrie erfolgen [GESSLER 1999]. Die Abkürzung Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) bedeutet Lichtverstärkung durch induzierte Emission. Diffraktometrie ist die Beugung von Lichtwellen an einem Hindernis. Monochromatisches, sehr intensives Laserlicht trifft auf Liposomen in einer Dispersion und wird abgelenkt. Es entstehen Beugungsbilder, die durch eine Sammellinse gelenkt und auf einen Detektor fokussiert werden [KECK und MÜLLER 2009]. Dabei erhobene Daten der Partikelgrößen und -verteilungen werden durch eine Software ausgewertet und präsentiert.

Verkapselungseffizienz (VE)

Die Verkapselungseffizienz (VE) gibt die Substanzmenge an Carboxyfluorescein (CF) an, die in den liposomalen Vesikeln eingeschlossen ist, bezogen auf die Gesamtmenge, die sich aus dem liposomalen Einschluss und der freien Substanzmenge zusammensetzt. Als Synonym für die Verkapselungseffizienz wird in der Literatur auch die Einschlusseffizienz (EE [%]) verwendet. Bei der Herstellung von Liposomen wird in keinem Fall der gesamte eingesetzte Farbstoff in die Vesikel eingekapselt. Die Verkapselungseffizienz (VE) wird wie folgt berechnet:

$$VE[\%] = 100\% * \frac{CF - \text{Konz. Intraliposomal} \left[\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right]}{CF - \text{Konz. Intraliposomal} \left[\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right] + CF - \text{Konz. frei} \left[\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right]}$$

Die Konzentration [ng/ml] des nicht verkapselten Farbstoffes in einer Liposomendispersion kann mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders gemessen werden. Dabei schirmen die Lamellen der Liposomen den eingekapselten Inhalt so ab, dass dieser nicht in die Messung mit eingeht. Zur Bestimmung der gesamten CF-Konzentration wird der Liposomendispersion TritonX-100[®], ein nichtionisches Tensid aus der Gruppe der Octylphenoethoxylate, das zur Lyse der Liposomen führt [NEW 1990], hinzugefügt.

Stabilität

Die Stabilität der Liposomen wird durch die Größenmessung und die Bestimmung des verkapselten Farbstoffes Carboxyfluorescein vor und nach der Verneblung untersucht.

2.3 Vorgehen und Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche am Herz-Lungen-Modell von Kaninchen durchgeführt. Herz und Lunge wurden dabei isoliert und in ein Beatmungs- und Perfusionssystem integriert. Für die inhalative Applikation wurden zunächst die Aerosolgeneratoren Optineb[®] (Ultraschallverneblungssystem) und Aeronex[®] Professional (piezoelektrisches Verneblungssystem) mit der radioaktiven Substanz Technetium (^{99m}Tc) charakterisiert. Ziel war die quantitative Bestimmung der in einer isolierten Kaninchenlunge deponierten Aerosolmenge, um den optimalen Vernebler für die nachfolgenden Versuche auszuwählen. Liposomen verschiedener Lipidzusammensetzung mit eingekapseltem Carboxyfluorescein wurden nach der Filmmethode [NEW 1990] hergestellt, extrudiert, zentrifugiert und charakterisiert. Zunächst wurde der unverkapselte Farbstoff Carboxyfluorescein vernebelt, die Übertrittskinetik ins Perfusat der isolierten Lunge bestimmt und mit dem Übertrittsverhalten des verkapselten Farbstoffes verglichen. Auf diese Weise wurden die Liposomen ermittelt, die für die nachfolgenden Versuche mit Iloprost am besten geeignet waren. Am isolierten Herz-Lungen-Modell wurde mit dem Wirkstoff U 46619, einem Thromboxananalogon, vor der Applikation von freiem und eingekapseltem Iloprost eine pulmonale Hypertonie erzeugt. Ziel war es zu untersuchen, ob der eingekapselte Wirkstoff Iloprost eine länger andauernde Drucksenkung als der freie Wirkstoff erzeugt.

3. Material und Methoden

Alle verwendeten Materialien (Chemikalien, Lösungen, Lösungsmittel, Perfusatzusammensetzungen, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Lipide und liposomale Formulierungen) sind im Anhang in den Tabellen A 1 bis A 7 aufgeführt.

3.1 Das isolierte Herz-Lungen-Modell beim Kaninchen

Es wurde ein experimenteller Versuchsaufbau verwendet, der 1994 im Rahmen einer Dissertation zur Untersuchung der Vasokonstriktion an vollständig vom Körper isolierten Kaninchenlungen entwickelt wurde [WEIßMANN 1994]. Alle Kaninchenlungen wurden selbst präpariert.

3.1.1 Versuchstiere

Die verwendeten Tiere waren weiße, männliche Kaninchen der Art *Oryctolagus cuniculus formis domestica* mit einem Gewicht zwischen 2,9 und 3,8 kg und einem Alter von 4 bis 5 Monaten. Sie wurden in regelmäßigem Hell-Dunkel-Wechsel von zwölf Stunden gehalten. Handelsübliches Alleinfutter für Kaninchen und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

3.1.2 Initiale Narkose und Antikoagulation

Die initiale Narkose diente dazu, das Tier bei Erhaltung der Spontanatmung bis zur Intubation in Narkose zu legen. Dazu wurde ein Gemisch aus Ketamin 10%ig und Xylazin 2%ig im Verhältnis 3:2, verdünnt mit 0,9%iger isotonischer Kochsalzlösung, verwendet. Entlang der Ohrvene wurden mit einer Schere die Haare entfernt und die Injektionsstelle mit Alkohol desinfiziert. Über einen Butterflykatheter wurden etwa 700 µl des Narkosegemisches zugeführt. Nach der

initialen Narkose wurde dem Tier zur Verhinderung der Koagulation 1 ml Heparin intravenös appliziert. Weitere intravenöse Gaben des Narkosegemisches führten zu tieferer Analgesie und Relaxation des Kaninchens. Während der weiteren Präparation wurden unter Kontrolle der Herztätigkeit über einen Zeitraum von 10 bis 20 Minuten ca. 3 ml des Ketamin/Xylazin-Gemisches gegeben.

3.1.3 Intubation

Das narkotisierte Tier wurde in Rückenlage fixiert und im Tracheal-, Thorax- und Abdomenbereich mit Braunollösung versehen. Mit 5 ml Xylocain wurde im Bereich der Trachea eine subkutane Quaddel gesetzt und dadurch eine Lokalanästhesie erreicht. Zwei Zentimeter cranial vom Sternum erfolgte die Inzision der Haut und Freipräparation der Luftröhre. Zwischen zwei Trachealspangen wurde ein Tubus eingebunden. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Tier mit einem Gasgemisch, zunächst ohne endexpiratorischen Druck, beatmet.

3.1.4 Beatmung

Das Beatmungssystem bestand aus einer Beatmungspumpe [Cat/Rabbit Ventilator, March-Hugstetten], von der ein Abschnitt eines Schlauchsystems als inspiratorischer Teil zur Lunge hin und ein expiratorischer Schenkel von der Lunge zurück zur Pumpe führte. Diese stellte ein Atemzugvolumen von 30 ml pro Minute und eine Beatmungsfrequenz von 30 Atemzügen pro Minute sicher. Die Beatmung erfolgte gegen einen endexpiratorischen Druck (PEEP, positive endexpiratory pressure) von 1 cm Wassersäule, sobald die Lunge vollständig aus dem Brustkorb entnommen und in das Perfusionssystem integriert wurde. Es wurde ein Gasgemisch zugeführt, das sich aus 21% Sauerstoff, 5,3% Kohlendioxid und 73,7% Stickstoff zusammensetzte. Über einen mit Luft gefüllten Katheter, der an den expiratorischen Systemteil angeschlossen war, wurde der Beatmungsdruck registriert.

3.1.5 Laparotomie und Thorakotomie

Mit dem Präparationsbesteck wurde die Muskulatur im Bereich von Abdomen und Thorax präpariert. Die Laparotomie erfolgte caudal des Processus xiphoideus, der dann mit einer Klemme fixiert wurde. In der Linea alba und entlang des Diaphragmas wurde das Abdomen eröffnet. Im Bereich des Processus xiphoideus wurde bei der Expiration das Zwerchfell vorsichtig gelöst, um die Lunge nicht zu beschädigen. Das Diaphragma ließ sich vorsichtig im Verlauf der Rippenbögen von der Thoraxwand lösen. Der Brustkorb konnte dann durch Auftrennen entlang des Sternums vollständig eröffnet werden. Klemmen dienten dazu, den Brustkorb offen zu halten und Blutungen zu stoppen. Mit Pinzetten wurde der Thymus stumpf präpariert, entfernt und dann mit einer Schere das Perikard eröffnet. An der Herzspitze erfolgte die Fixierung mit einer Klemme, Arteria pulmonalis und Aorta ascendens wurden herznah locker mit Fadenschlingen umgeben. Mit einer Schere wurde der rechte Ventrikel des schlagenden Herzens eingeschnitten, durch die Öffnung ein Perfusatschlauch in die Arteria pulmonalis vorgeschoben und mit der Fadenschlinge vor der Bifurkation eingebunden, damit beide Lungenhälften gleichmäßig von Elektrolytlösung durchströmt werden konnten. Die Temperatur der Elektrolytlösung wurde reguliert durch eine Systemkühlung (Frigomix, Braun, Melsungen) und betrug 4°C, um metabolische Prozesse zu unterbinden. Sofort danach wurde die Herzspitze mit einer Schere abgesetzt und so eine Abflussmöglichkeit geschaffen, um die Überdehnung der Herzmuskulatur und Lungengefäße zu vermeiden. Die Aorta ascendens wurde herznah, vor Austritt der Arteriae coronariae, mit der vorgelegten Fadenschlinge abgebunden. Dadurch erfolgte die Tötung des in tiefer Narkose befindlichen Tieres.

3.1.6 Integration der Lunge in das Messsystem

Herz und Lunge konnten ohne Traumatisierung präpariert und dem Thorax entnommen werden. In die Herzspitze wurde ein Konnektionsstück mit einer Nadel-Faden-Kombination eingenäht, nachdem die Herzklappen entfernt worden

waren. So konnte ein störungsfreier Abfluss gewährleistet werden. Das linke Herzohr wurde mit einer Fadenschlinge abgebunden.

Das Präparat wurde unter Fixation an einer Wägezelle zur Registrierung des Gewichtes über den Versuchszeitraum in einen doppelwandigen Glasbehälter gehängt. Der Elektrolytkreislauf wurde durch Verbindung des Konnektionsstückes mit dem „linksvenösen Schenkel“ des Schlauchsystems geschlossen. Unter Registrierung des pulmonal-arteriellen Drucks (PAP, pulmonary artery pressure), des linksvenösen Drucks (LVP, left venous pressure), des Beatmungsdrucks und des Lungengewichts erfolgte eine Steigerung der Fließgeschwindigkeit des Perfusates auf 100 ml/min. Gleichzeitig wurde schrittweise die Temperatur auf physiologische 39,5°C erhöht. Nach Erreichen der maximalen Fließgeschwindigkeit und optimaler Temperatur erfolgte ein vollständiger Perfusatwechsel; der Filter, der die Blutzellen zurückhielt, wurde vor dem Versuchsbeginn mit Hilfe von Klemmen aus dem System entfernt. Das Perfusionsmedium wurde während der gesamten Dauer des Experimentes nicht mehr ausgetauscht. Der LVP wurde auf 1,7 mmHg konstant eingestellt.

3.1.7 Perfusionskreislauf

Eine Peristaltikpumpe [Roller Pump BP 742, Fresenius, Bad Homburg] führte über die Arteria pulmonalis der Lunge ein Perfusionsmedium zu. Dies wurde über einen Filter [Pall Cardioplegia Plus 0,2 µm, Pall Biomedical Corp., Fajardo, USA] geleitet, um im Stadium der Lungenpräparation, Spülung und Systemadaptation die Blutkörperchen vollständig zu entfernen. Nach der Lungenpassage trat das Perfusionsmedium aus den Venae pulmonales über den an der Herzspitze eröffneten linken Ventrikel aus. Durch ein Schlauchsystem erfolgte die Weiterleitung mit der Möglichkeit zur Regulation des linksvenösen Drucks in einen der beiden Vorratsbehälter. Im Perfusionskreislauf befanden sich zwei nebeneinander über Schlauchsysteme verbundene Glasbehälter. Dadurch bestand die Möglichkeit, das Medium während des Versuches auszutauschen, ohne den Perfusatfluss zu unterbrechen.

Nach der Lungenpassage ermöglichten Drei-Wege-Hähne eine Abnahme von Perfusatproben. Neben dem linksvenösen Druck (LVP) wurde der pulmonal-arterielle Druck (PAP) registriert.

Die Erfassung von PAP und LVP erfolgte über elektromechanische Drucksensoren. In dem der Lunge zuführenden und im abführenden Schlauchsystem befand sich je ein weiterer, dünnerer (Innendurchmesser 1,0 mm, Außendurchmesser 1,5 mm) hartwandiger Katheter, der im Folgenden als Innenkatheter bezeichnet wird. Der Innenkatheter war vollständig mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllt und reichte zur Registrierung des PAP bis an die Bifurkation von Arteria pulmonalis sinistra und Arteria pulmonalis dextra. Er war mit einem elektromechanischen Druckumwandler verbunden, der das Drucksignal in ein elektrisches Signal umwandelte, welches ein Computer registrierte. Analog erfolgte die Messung des LVP im linken Ventrikel.

Für die Präparation wurde das Perfusionsmedium auf 4°C gekühlt. Anschließend konnte das Perfusionsmedium bei langsamer Adaptation des Modells an physiologische Bedingungen mit Hilfe eines Thermostats (Thermomix BU, Braun, Melsungen) schrittweise auf 39,5°C erwärmt werden. Das isolierte Herz-Lungen-Präparat befand sich in einem doppelwandigen, gläsernen Behälter, um während des Versuchs konstante, von der Umgebungstemperatur unabhängige Bedingungen zu wahren. Das Füllvolumen des Perfusionssystems betrug 295 ml.

3.1.8 Registrierung des Lungengewichtes

Nach der Präparation wurde die isolierte Lunge an einer elektronischen Wägezelle [Wägezelle Typ U1, Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt] fixiert. Das verstärkte elektrische Signal der Wägezelle zeichnete ein Schreiber [Rikadenki R 50 Series, Rikadenki Electronics GmbH, Freiburg] auf.

3.1.9 Eignung der Lungenpräparate für die Versuche

Die Lungenpräparate mussten folgende Voraussetzungen erfüllen, um in das weitere Versuchsgeschehen aufgenommen zu werden:

- Einheitliches Aussehen, keine Atelektasen, keine Verletzungen durch Präparationsfehler;
- äußerlich weißes Lungengewebe zeigte an, dass es ausreichend vom Medium durchspült wurde;
- nach Beginn der Rezirkulation mindestens 20 min. Konstanz des PAP, des Beatmungsdruckes und des Lungengewichtes;
- Normbereich für den PAP: 4 bis 10 mmHg;
- Normbereich für den Spitzenbeatmungsdruck: 6 bis 11 mmHg;
- keine Flüssigkeitsverluste durch Traumatisierung der Lunge oder Undichtigkeit an Arteria pulmonalis und Herzspitze.

3.2 Herstellen der Lösungen

Im Folgenden wird die Herstellung der für die weiteren Versuche benötigten Lösungen beschrieben.

3.2.1 Acetatpuffer

Acetatpuffer 0,1 mol/l mit einem pH-Wert von 4,7 wurde hergestellt, indem 6,0 g Essigsäure und 8,2 g Natriumacetat in 900 ml Aqua dest. auf einem magnetischen Rühr Tisch in einem Becherglas gelöst wurden. Die Lösung wurde unter pH-Kontrolle durch die Zugabe von Natriumhydroxid (NaOH) 10M sowie Salzsäure (HCl) 1M auf einen pH-Wert von 4,7 eingestellt. Das Endvolumen betrug 1000 ml Acetatpuffer.

3.2.2 Carboxyfluoresceinlösung

Ziel war es, eine Carboxyfluoresceinlösung mit einem pH-Wert von 7,4 und einer Konzentration von 50 mg/ml herzustellen. In einen Maßkolben mit einem Füllvolumen von 100 ml wurden mit einem Glastrichter 5 g CF-Pulver eingefüllt. Dazu kamen ein kleiner Rührfisch und etwa 50 ml phosphatgepufferte Salzlösung. Die Löslichkeit des CF-Pulvers erhöhte sich durch tropfenweise Zugabe von Natriumhydroxid 10M, bis sich das Pulver vollständig gelöst hatte und ein Farbumschlag von hellgelb in sehr dunkel orange sichtbar wurde. Das Volumen wurde durch Zugabe von phosphatgepufferter Salzlösung (Kapitel 3.2.4) kontinuierlich bis auf ca. 90 ml erhöht. Durch tropfenweise Zugabe von phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und NaOH 10M oder HCl 1M wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das Endvolumen mit Aqua dest. auf 100 ml gebracht. Zum Schutz vor Licht wurde Aluminiumfolie um den Kolben befestigt und die Lösung bei einer Temperatur von 6°C aufbewahrt. Die Verwendungsdauer der Lösung betrug maximal vier Wochen. Unverbrauchte Reste wurden nach Ablauf dieser Zeit jeweils verworfen.

3.2.3 Iloprostlösung

Ziel war es, eine Iloprostlösung mit einer Wirkstoffkonzentration von 50 µg/ml und einem pH-Wert von 4,7 herzustellen. Dazu wurden 94 ml Iloprost (20 µg/ml) im Rotationsevaporator bei 37°C Wasserbadtemperatur vorsichtig auf 9,4 ml eingeeengt und anschließend mit 28,125 ml Acetatpuffer (Kapitel 3.2.1) aufgefüllt. Die Herstellung erfolgte wie bei KLEEMANN et al. [2007], um die im weiteren Versuchsverlauf erhobenen Daten vergleichen zu können.

3.2.4 Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (PBS)

Die Substanzen Natriumchlorid (80 g), Kaliumchlorid (2 g), di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (11,5 g) und Kaliumdihydrogenphosphat (2 g) wurden auf einer Waage in einem Becherglas abgewogen. Mit Hilfe eines

Rührfisches wurden die Chemikalien auf einer Magnetplatte bei Raumtemperatur in 1000 ml Aqua dest. gelöst und unter der Abzugshaube steril gefiltert. Die phosphatgepufferte Salzlösung wurde bei Raumtemperatur gelagert. Die Stammlösung war 10-fach konzentriert und musste vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 verdünnt werden. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung der einfachen phosphatgepufferten Salzlösung erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur.

3.2.5 Triton[®]-X-100– Lösung

Für die Herstellung der Tritonlösung wurde ein Gramm Triton[®]-X-100 mit 99 g phosphatgepufferter Salzlösung (Kapitel 3.2.4) verdünnt. Die Lösung wurde zur Lyse der Liposomen verwendet.

3.2.6 Eichreihenlösungen für den Fluoreszenzreader

Es wurden insgesamt drei Eichreihenlösungen hergestellt, mit denen das Fluoreszenzmessgerät (Fluorescence plate reader, Bio-Tec FL 600, USA) jeweils vor Versuchsbeginn geeicht wurde. Die genaue Zusammensetzung der Eichreihen, die aus PBS, Triton[®]-X-100 mit PBS und Elektrolytlösung bestanden, kann dem Anhang, Tabelle A 7, entnommen werden. Die Ausgangskonzentration der Carboxyfluoresceinlösung betrug 50 mg/ml. Davon wurden 100 µl entnommen und mit Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Daraus ergab sich eine CF-Konzentration von 50 µg/ml (Stammlösung).

In den einzelnen Eichreihen wurden CF-Konzentrationen von 2000 ng/ml, 1000 ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml und 1 ng/ml verwendet. Die Verdünnungsreihen wurden in Maßkolben aus braunem Glas, die auf 10 ml geeicht waren, hergestellt. Problematisch wurde das Mischen der CF-Konzentrationen von 10 ng/ml und 1 ng/ml. Die Tabelle zeigt, dass es notwendig war, der Stammlösung 2 µl bzw. 0,2 µl zu entnehmen. Dies führte aufgrund der kleinen Mengen zu Eichreihenfehlern. Eine höhere Genauigkeit konnte erreicht

werden, indem der CF-Lösung mit der Konzentration von 1000 ng/ml bzw. 100 ng/ml je 100 µl entnommen und je nach Eichreihe mit PBS, Triton und PBS oder Elektrolytlösung und PBS verdünnt wurden.

Die Maßkolben mit den Eichreihen wurden im Kühlschrank bei einer Temperatur von 6°C gelagert. Die Lösungen wurden jeweils nach vier Wochen nicht mehr verwendet und verworfen.

3.3 Radioaktive Charakterisierung des Ultraschall- und des piezoelektrischen Verneblers

Die radioaktive Charakterisierung eines Ultraschallverneblers [Optineb[®], Nebu-Tec, Elsenfeld] und eines piezoelektrischen Verneblers [Aeroneb[®], Aerogen, USA] erfolgte an der isolierten, blutfrei perfundierten Kaninchenlunge. Zur quantitativen Bestimmung der in der Kaninchenlunge deponierten Aerosolmenge wurde eine radioaktive Tracertechnik eingesetzt. Technetium wurde mit 6 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Beide Vernebler wurden jeweils mit 3 ml der Technetiumlösung befüllt. Das Gewicht der Vernebler wurde vor und nach der Verneblung ermittelt. Für die Versuche wurde jeweils einer der Vernebler in das inspiratorische Schlauchsystem des Beatmungsapparates der isolierten Lunge integriert. Die Dauer der Verneblung betrug für den Ultraschallvernebler zehn Minuten und für den piezoelektrischen Vernebler acht Minuten bis zum Erreichen der jeweils gerätetypischen Restmenge. Im Anschluss an die Verneblung erfolgte die Messung der Radioaktivität von 1 ml der Ausgangslösung, der Lunge frontal und seitlich, des expiratorischen Filters und von 1 ml der Perfusatlösung, die die jeweilige Lunge während des gesamten Versuchs durchspült hat, mit einem Gammacounter. Der Versuch wurde jeweils viermal durchgeführt.

3.3.1 Der Ultraschallvernebler

Ultraschallvernebler erzeugen mechanische Schwingungen, die von der Oberfläche einer zu vernebelnden Flüssigkeit Aerosoltröpfchen ablösen. Für die vorliegende Arbeit wurde das Gerät Optineb[®] (Nebutech, Elsenfeld) eingesetzt. Der Ultraschallschwinger dieses Geräts hat eine Frequenz von 2,4 MHz, die Verneblung erfolgt indirekt durch Übertragung der Schallwellen über eine Koppelflüssigkeit auf die Medikamentenlösung. Das so erzeugte Aerosol wird mit dem Luftstrom in eine in das Gerät integrierte Impaktionsvorrichtung geleitet, in der vorzugsweise größere Aerosolpartikel abgeschieden werden. Dadurch reduziert sich der mediane Massendurchmesser (MMAD, mass median aerodynamic diameter), der laut Herstellerangaben in einem Bereich zwischen 3 µm und 6 µm liegt.

3.3.2 Der piezoelektrische Vernebler

Der verwendete piezoelektrische Vernebler (Aeroneb[®] Professional, Aerogen, Irland) basiert auf einem elektronischen Mikropumpverfahren. Eine gewölbte Blendenplatte mit konischen Bohrungen wird in mechanische Schwingungen versetzt (~ 100 kHz). Dadurch wird die zu vernebelnde Flüssigkeit durch die Bohrungen gepumpt und es bilden sich Aerosoltropfen auf der Außenseite der Blendenplatte. Der mediane Massendurchmesser des erzeugten Aerosols liegt bei 2,1 µm mit niedrigem Residualvolumen und minimaler Kondensation (Herstellerangabe).

3.4 Herstellung von Liposomen

Zur Herstellung der liposomalen Dispersionen in der vorliegenden Arbeit wurden die Lipide Cholesterol (CH, Sigma Aldrich, Taufkirchen, D), 1,2 Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine (DPPC, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) und Sphingomyelin (SM, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) verwendet. Gelagert

wurden die Lipide als Trockensubstanz in Glasbehältern bei 6°C im Kühlschrank. Die Auswahl der Lipide erfolgte auf der Grundlage der Ergebnisse von WASCHKOWITZ [2002] und KLEEMANN [2007]. Die liposomalen Dispersionen der Zusammensetzungen DPPC:CH und DPPC:CH:SM zeichneten sich in den o.g. Untersuchungen durch eine hohe Einschussrate und eine hohe Stabilität gegenüber der Verneblung aus.

Die einzelnen Schritte der Herstellung von Liposomen, die sich zusammensetzt aus der Fertigung eines Lipidfilms, der Hydrierung, der Extrusion und der abschließenden Zentrifugation, werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

3.4.1 Filmmethode

Die Herstellung des Lipidfilms erfolgte nach der Filmmethode [TORCHLIN AND WEISSIG 2003]. Die Lipide, die als Trockensubstanz vorlagen, wurden auf einer Feinwaage abgewogen (Tabelle 3-1: Lipidmengen für die Herstellung des Lipidfilms) und in einen birnenförmigen Rundhalskolben mit einem Fassungsvermögen von 500 ml gegeben. Hinzugefügt wurde ein Lösungsmittelgemisch von 20 ml aus Methanol und Chloroform im Volumenverhältnis 3:7. Der Kolben wurde von Hand geschwenkt, bis die Lipide sich vollständig gelöst hatten.

Tabelle 3-1: Lipidmengen für die Herstellung des Lipidfilms

	DPPC [mg]	CH [mg]	SM [mg]
DPPC:CH 7:3	128,5	29,0	
DPPC:CH:SM 7:3 + 2%	128,5	29,0	3,15

(CH = Cholesterol, DPPC = Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin, SM = Sphingomyelin)

Zum Abdestillieren des Lösungsmittelgemisches und damit sich ein homogener, transparenter Lipidfilm am Rundhalskolbenboden bilden konnte, wurde das Gefäß

mit einer Kombiklammer am Rotationsverdampfer befestigt. Der Kolben wurde dann abgesenkt, bis er mit dem Lösungsmittel-Lipid-Gemisch vollständig in ein 60°C warmes Wasserbad eintauchte. Durch die Spirale des Verdampferkühlers wurde eisgekühltes Wasser geleitet. Dadurch schlug sich das verdampfende Lösungsmittelgemisch an der Spirale nieder und tropfte in einen Auffangbehälter. Der Rundhalskolben rotierte zwei Stunden im Wasserbad, 15 min bei 0,9 bar, 45 min bei 0,5 bar und dann eine Stunde bei 0 bar. Der Unterdruck im Vergleich zum atmosphärischen Druck wurde durch eine Vakuumpumpe erzeugt.

Hydrierung des Lipidfilms und Substanzzugabe

Der nach optischer Kontrolle vollständig getrocknete Lipidfilm wurde anschließend im 60°C warmen Wasserbad hydriert. Dafür wurden abhängig von der Versuchsreihe je 5 ml Carboxyfluorescein- oder Iloprost-Lösung in den Rundhalskolben gegeben. Nach zwei Stunden Rotation im Wasserbad bildete sich spontan eine Liposomendispersion, die zur Stabilisierung der Lipidmembranen eine Stunde bei 6°C inkubiert wurde.

Extrusion

Die Dispersion wurde anschließend mit einem Hamilton®-Spritzen-System extrudiert. Zur Vorbereitung wurde ein Polycarbonat-Membranfilter mit einer Porengröße von 400 nm für 30 min in ein kleines Becherglas verbracht, das mit Pufferlösung befüllt war. Der Wärmeschrank wurde auf eine Temperatur von 65°C eingestellt, um die Extrusionsapparatur darin vorzuwärmen. Die Polycarbonatmembran wurde in den Extruder eingesetzt. Jeweils 1 ml der Liposomendispersion wurde für 5 min im Wärmeschrank erhitzt und 21 Mal mit Hilfe des LiposoFast-Extruders (Avestin, Ottawa, Canada) durch die Polycarbonat-Membran filtriert [entsprechend OLSON et al. 1979]. Dadurch entstanden unilamellare Liposomen mit einer engen Größenverteilung, die mittels Laserdiffraktometer bestimmt wurde (s. Kap. 3.4.2 und Tab. 4-2). Die Lagerung

der kolloidalen Vesikel erfolgte nach der Extrusion in einem mit Eis gefüllten Behälter. Nach Abschluss des Extrusionsschrittes wurde die Dispersion zwölf Stunden im Kühlschrank bei einer Temperatur von 6°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Liposomendispersion.

Zentrifugation

Nach der Liposomenherstellung wurde die Kühl-Zentrifugation (Hettich, Tuttlingen) durchgeführt [NEW 1990]. Diese erfolgte bei einer Temperatur von 4°C insgesamt vier Mal je 45 Minuten bei einer relativen Zentrifugationsbeschleunigung (RZB) von 4500 rpm. Der Überstand wurde nach jedem Zentrifugationsschritt mit einer Pipette entfernt und das Pellet mit der Menge (5 ml), die entnommen wurde, wie folgt gewaschen:

- bei der Herstellung von carboxyfluoresceinhaltigen Vesikeln mit PBS bzw.
- bei der Herstellung der mit Iloprost beladenen Liposomen mit Acetatpuffer.

Die Dispersion wurde dabei mit 30 Pipettenhuben durchmischt und erneut zentrifugiert. Die Aufbewahrung der fertigen Liposomendispersion erfolgte im Kühlschrank bei einer Temperatur von 6°C. Die Verneblung der hergestellten Liposomen erfolgte spätestens am nächsten Tag.

3.4.2 Bestimmung von Größe, Verkapselungseffizienz und Stabilität

Zur Charakterisierung der Liposomendispersionen gehörten die Größenmessung, die Bestimmung der Verkapselungseffizienz und Untersuchungen bezüglich der Stabilität. Die Größenmessung erfolgte sowohl für die carboxyfluoresceinhaltigen (CF) als auch für die iloprosthaltigen Liposomen. Die Verkapselungseffizienz und die Stabilität wurden für die carboxyfluoresceinhaltigen Vesikel in der vorliegenden Arbeit ermittelt. Für mit Iloprost beladene Liposomen sind bereits Stabilitätsuntersuchungen mit Tritium durchgeführt worden [KLEEMANN et al. 2007], die in dieser Arbeit bei der Diskussion der Ergebnisse zugrunde gelegt wurden.

Größenmessung der carboxyfluorescein- bzw. iloprosthaltigen Liposomen-Dispersionen

Die Liposomengröße und die Partikelgrößenverteilung wurden mit Hilfe eines Laserdiffraktometers bestimmt. Dabei wurden 100 µl einer Liposomendispersion in 40 ml ultra sterilem Wasser verdünnt und in eine Küvette gegeben. Die Küvette wurde in den Laserstrahl des Diffraktometers gestellt und es wurden jeweils sechs Messungen durchgeführt.

Verkapselungseffizienz

Die Verkapselungseffizienz (VE) gibt die Substanzmenge an Carboxyfluorescein an, die in den liposomalen Vesikeln durch den Herstellungsvorgang eingeschlossen ist, und zwar in Bezug auf die eingesetzte Gesamtmenge CF. Die Gesamtmenge setzt sich aus dem eingeschlossenen und dem freien CF zusammen. Bei der Herstellung von Liposomen wird in keinem Fall der gesamte eingesetzte Farbstoff in die Vesikel eingekapselt. Nicht eingeschlossenes CF befindet sich an der Außenseite der Liposomen und in der Dispersion [SCHUBERT et al. 1991]. In einer Formel kann die Verkapselungseffizienz wie folgt dargestellt werden:

$$VE (\%) = 100 * \frac{\text{liposomaler Einschluss}}{(\text{liposomaler Einschluss} + \text{freie Substanzmenge})}$$

Die Liposomendispersion wurde mit 30 Pipettenhüben durchmischt, da die Liposomen bereits nach kurzer Zeit sedimentierten. Zwei Proben mit je 700 µl wurden entnommen und jeweils in ein Eppendorfgefäß gefüllt. Den beiden Eppendorfgefäßen wurde je eine Probe von 100 µl entnommen und mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Der ersten Verdünnungsreihe wurden wiederum je 100 µl entnommen und in Eppendorfgefäßen mit PBS auf 1 ml aufgefüllt. Im zweiten Verdünnungsschritt wurde PBS durch Triton substituiert. Mit je 30 Pipettenhüben

erfolgte die Durchmischung, wobei ein Schütteln der Gefäße vermieden wurde. Ausnahmen waren die Eppendorfgefäße der zweiten Verdünnungsreihe mit Triton. Diese wurden für 10 Minuten zur besseren Durchmischung und vollständigen Zerstörung der Liposomen auf eine Rüttelplatte gestellt, um so die Gesamtmenge an eingesetztem Farbstoff zu bestimmen.

Der Fluoreszenzreader wurde mit der PBS- und der Triton-Eichreihe geeicht (Kapitel 3.2.6 und Tabelle A 7). 100 µl jeder Probe wurden in Dreifachbestimmung auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und im Fluoreszenzreader gemessen. Damit waren die für die Berechnung der Verkapselungseffizienz notwendigen Werte vorhanden.

Stabilität der carboxyfluoresceinhaltigen Liposomen gegenüber der Verneblung

Drei Milliliter der Liposomendispersion wurden durch den Einfülldeckel der Verneblereinheit in das Verneblungssystem Aeroneb® Professional gefüllt. Das Gewicht der Verneblereinheit wurde vor und nach der Verneblung gemessen. Der piezoelektrische Vernebler wurde auf einen T-förmigen Adapter gesteckt und das austretende Aerosol mit einem Gasfluss von 10 l/min auf einen Objektträger fokussiert. Die abgeschiedene Flüssigkeit tropfte dann vom Objektträger in ein Eppendorfgefäß. Die Verneblung wurde mit der gleichen Versuchsanordnung zur Kontrolle wiederholt. Mit Hilfe des Fluoreszenzreaders wurde die Konzentration des freien und des gesamten Carboxyfluoresceinfarbstoffes ermittelt. Die Differenz der beiden Werte ergab die Konzentration des nach der Verneblung noch verkapselt vorliegenden Farbstoffes in ng/ml. Die sich daraus ergebende Verkapselungseffizienz (%) ist ein grundlegender Parameter, der die Stabilität der Liposomen gegenüber der Verneblung anzeigt.

3.4.3 Verneblung am isolierten Lungenmodell

Verneblung von freiem und in Liposomen eingekapseltem Carboxyfluorescein

Für die Verneblung von freiem Carboxyfluorescein (Konzentration 500 µg/ml), von 1,2 Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine-Cholesterol-Liposomen (DPPC:CH-Liposomen) und von 1,2 Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine-Cholesterol-Sphingomyelin-Liposomen (DPPC:CH:SM-Liposomen) wurde der piezoelektrische Vernebler Aeroneb® Professional verwendet. Die Verneblung begann jeweils 30 min nachdem die isolierte Kaninchenlunge in das Messsystem integriert worden war, die Temperatur 39,5°C erreicht hatte und der Perfusatwechsel erfolgt war. Jeweils 3 ml der Dispersion wurden in den Vernebler gefüllt und das Gewicht vor und nach der Verneblung registriert. Der Vernebler wurde in das Beatmungssystem des isolierten Lungenmodells integriert. Die Dauer der Verneblung betrug acht Minuten. Zur Probenentnahme wurden je 700 µl Perfusat durch einen Drei-Wege-Hahn aus dem von der Lunge wegführenden Schlauchsystem des isolierten Lungenmodells entnommen. Über einen Zeitraum von 5 Stunden wurden in der ersten halben Stunde im Abstand von zunächst 5 min und dann alle 10 min je 700 µl entnommen. Die Proben wurden bei Raumtemperatur in Eppendorfgefäßen gelagert. Im Anschluss an den Lungenversuch wurde mit dem Fluoreszenzreader die Konzentration des Carboxyfluoresceins der Perfusatproben gemessen. Dazu wurde aus den Eppendorfgefäßen jede Probe als Dreifachbestimmung auf Mikrotiterplatten pipettiert. Die Verneblungsversuche wurden jeweils viermal durchgeführt.

Verneblung von freiem und in Liposomen eingekapseltem Iloprost

Grundlage für die Versuchsanordnung war die Erzeugung eines pulmonalen Hypertonie-Modells mit dem Wirkstoff U 46619. Das isolierte Herz-Lungen-Modell wurde wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben nach der Präparation in das

Messsystem integriert. Danach erfolgte über den Injektionsstutzen des Schlauchsystems eine Dauerinfusion mit U 46619 durch einen Perfusor. Der pulmonal-arterielle Druck wurde erheblich gesteigert und zwischen 22 mmHg und 25 mmHg eingestellt.

Die Iloprostlösung und die iloprosthaltige Liposomendispersion wurden wie oben beschrieben vernebelt. Die Füllmenge des Aeroneb® Professional- Verneblers betrug für die Iloprostlösung und die Liposomendispersion 2,5 ml. Eine Probenentnahme während des Versuches entfiel, da die Versuche über die pharmakodynamische Wirkung von Iloprost ausgewertet wurden. Dazu wurde der pulmonal-arterielle Druck gemessen. Die Versuche wurden viermal durchgeführt.

3.5 Statistische Untersuchungen

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zum Vergleich der Werte der Gesamtdosition in der Lunge sowie der Depositionsfraction zwischen beiden verwendeten Verneblertypen wurde der Mann-Whitney-U-Test (nichtparametrischer Test) verwendet. Dieser Test eignete sich am besten dazu, die Daten der vorliegenden Arbeit statistisch auszuwerten, da zwei unabhängige Gruppen mit ordinalskalierten Daten verglichen wurden. Laut Shapiro-Wilk-Statistik liegt für einige Parameter keine Normalverteilung vor. Dies wäre, vor allem bei den geringen Stichprobengrößen, eine Voraussetzung für die Signifikanzprüfung mittels t-Test. Der U-Test ist in diesem Fall die Alternative der Wahl. Die Durchführung der statistischen Analyse erfolgte mit Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Da es sich um eine explorative Datenanalyse bei dem Vergleich der beiden Vernebler handelte, wurde auf eine α -Fehler-Kumulierung verzichtet. Dafür wären weitere aufbauende Studien mit mehr Versuchen notwendig.

4. Ergebnisse

4.1 Radioaktive Charakterisierung der Vernebler

Mittels Verneblung von ^{99m}Tc Technetium erfolgte die radioaktive Charakterisierung der Verneblungssysteme Optineb[®] und Aeroneb[®] Professional. Die Versuche dienten der quantitativen Bestimmung der in der isolierten Kaninchenlunge deponierten Aerosolmenge und sollten zeigen, welcher Verneblertyp besser für die folgenden Versuche geeignet ist.

Die Gesamtdeposition in der Lunge [μl] errechnet sich durch Division des halbwertszeitkorrigierten Mittelwertes der Aktivität der Lunge [cps] durch die halbwertszeitkorrigierte Aktivität von einem Milliliter NaCl-Technetium-Lösung.

Die exhalierete Aerosolmenge [μl] wird ermittelt, indem die halbwertszeitkorrigierte Aktivität des expiratorischen Filters [cps] geteilt wird durch die halbwertszeitkorrigierte Aktivität von einem Milliliter NaCl-Technetium-Lösung [cps]. Die Depositionsfraction ergibt sich aus der Division der Aktivität des Mittelwertes der Lunge [cps] durch die Summe von Mittelwert der Lunge [cps] und Aktivität des expiratorischen Filters [cps]. In Tabelle 4-1 sind die Ergebnisse der radioaktiven Charakterisierung mittels Verneblung von ^{99m}Tc Technetium mit dem Ultraschallvernebler und dem piezoelektrischen Vernebler gegenübergestellt.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der radioaktiven Charakterisierung der Verneblungssysteme Optineb® und Aeroneb® Professional (n=4)

Versuche	Optineb® Mittelwert ± Standardabweichung	Aeroneb®Professional Mittelwert ± Standardabweichung
Aktivitäten, halbwertszeitkorrigiert:		
Aktivität 1 ml [cps]	3304 ± 132	3270 ± 587
Lunge frontal [cps]	203 ± 108	1293 ± 140
Lunge seitlich [cps]	200 ± 106	1282 ± 103
Lunge Mittelwert [cps]	202 ± 107	1287 ± 120
Exspiratorischer Filter [cps]	368 ± 116	1248 ± 209
Perfusat 1 ml [cps]	0	0
Gesamtdeposition Lunge [µl]	61 ± 31	400 ± 56 ^a
Exhalation [µl]	111 ± 33	382 ± 17
Depositionsfraktion	0,34 ± 0,07	0,51 ± 0,03 ^b

Signifikanzen für den Vergleich mit dem Optineb®-System: ^a $p = 0,029$; ^b $p = 0,029$.

4.2 Versuche mit Carboxyfluorescein

Zunächst erfolgte die Charakterisierung der hergestellten Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin-Cholesterol- (DPPC:CH) und Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin-Cholesterol-Sphingomyelin- (DPPC:CH:SM) Liposomenchargen, um die Eignung für die Verneblung in das Modell der isolierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge zu prüfen. Für die CF-Versuche wurde eine Korrekturrechnung durchgeführt und abschließend erfolgte die Darstellung der Ergebnisse der CF-Versuche in der Abbildung 4.1.

4.2.1 Charakterisierung der carboxyfluoresceinhaltigen Liposomen

Die hergestellten DPPC:CH- und DPPC:CH:SM- Liposomenchargen wurden einer *in-vitro*-Qualitätskontrolle mittels Fluoreszenzspektroskopie unterzogen und dabei Verkapselungseffizienz [%], verkapseltes CF [%], freies CF [%] und der Anteil von eingeschlossenem CF nach der Verneblung [%] bestimmt. Mit dem Fluoreszenzreader wurde zunächst die Konzentration [ng/ml] des nicht verkapselten Farbstoffes in den Liposomendispersionen gemessen. Zur Bestimmung der gesamten CF-Konzentration wurde den Liposomendispersionen anschließend TritonX-100[®] hinzugefügt, das zur Lyse der Liposomen führte. Aus der CF-Gesamtkonzentration und der Konzentration von freiem CF wurden Verkapselungseffizienz [%] (Kapitel 2.2.5 Charakterisierung), verkapseltes CF [%] und freies CF [%] berechnet. Für die Stabilitätsuntersuchung der Liposomenchargen wurden die Messungen und Berechnungen nach der Verneblung wiederholt. Mit Hilfe eines Laserdiffraktometers erfolgte die Untersuchung der Liposomengrößen [µm] nach Extrusion und Verneblung. Die in Tabelle 4-2 angegebenen Werte der medianen Volumendurchmesser setzten sich jeweils aus sechs Einzelmessungen zusammen.

Tabelle 4-2: Charakterisierung der mit Carboxyfluorescein (CF) beladenen DPPC:CH - Liposomen und der DPPC:CH:SM 2% - Liposomen in den eingesetzten Dispersionen

	DPPC:CH – Liposomen [Mittelwert ± Standardabweichung]	DPPC:CH:SM 2%- Liposomen [Mittelwert ± Standardabweichung]
CF Verkapselungseffizienz [%]	1,75 ± 0,25	2,16 ± 0,32
Verkapseltes CF [%] in Dispersion	97,36 ± 0,40	97,74 ± 0,41
Freies CF [%] in Dispersion	2,64 ± 0,40	2,26 ± 0,41
Anteil von verkapseltem CF nach der Verneblung [%]	72,06 ± 0,48	71,49 ± 0,18
Medianer Volumendurchmesser nach Extrusion [µm]	0,87 ± 0,03	1,02 ± 0,08
Medianer Volumendurchmesser nach Verneblung [µm]	1,16 ± 0,10	1,17 ± 0,09

Die DPPC:CH– Liposomen unterschieden sich lediglich geringfügig von den DPPC:CH:SM 2%- Liposomen. In Bezug auf Verkapselungseffizienz, verkapseltes CF und freies CF sowie beim Anteil von verkapseltem CF nach der Verneblung ergaben die durchgeführten Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die Größe der DPPC:CH – Liposomen vor der Verneblung war mit 0,87 µm deutlich geringer als die der Liposomen mit Sphingomyelin (1,02 µm). Nach der Verneblung konnte kein Größenunterschied in beiden Liposomendispersionen festgestellt werden.

4.2.2 Korrekturrechnung

Für die im Perfusat gemessenen CF-Konzentrationen [ng/ml] musste eine Korrekturrechnung durchgeführt werden, da die Perfusatsmenge im Laufe eines Versuches abnehmen kann. Ursache dafür ist die lange Versuchsdauer von ca. fünf Stunden. Die Lungengefäße werden durchlässiger, der pulmonal-arterielle Druck kann ansteigen und damit kommt es zum Austritt von Flüssigkeit in das Lungengewebe und aus dem Lungengewebe heraus. Das Ausmaß der Veränderung hängt von der jeweiligen Lunge und deren physiologischer Ausgangskonstitution ab. Die Formel für die Korrekturrechnung lautet:

$$C_{\text{corr}}[t] = \frac{C[t] * V_p[t] + (V_p[0] - V_p[t]) * \frac{C[t]}{2}}{V_p[0]}$$

$$C_{\text{corr}}[t] = C[t] * \frac{V_p[t]}{V_p[0]} + \frac{1}{2} * \frac{1 - V_p[t]}{V_p[0]}$$

$$C_{\text{corr}}[t] = \frac{C[t]}{2} * \left(\frac{V_p[t]}{V_p[0]} + 1 \right)$$

$$V_p[t] = (V_p[0] - A_p[\text{ml}] * t[\text{min}])$$

$$A_p[\text{min}] = (V_p[0] - V_p[300]) / 300$$

$C_{\text{corr}}[t]$ CF-Konzentrationskorrektur [ng/ml] zum Zeitpunkt t [min]

$C[t]$ CF-Konzentration [ng/ml] zum Zeitpunkt t [min]

CF [ng/ml] Carboxyfluoresceinkonzentration [ng/ml]

$V_p[0]$ Perfusatsvolumen [ml] zum Zeitpunkt 0, das sich zusammensetzt aus dem Perfusatsvolumen, das sich in den Gefäßen und dem Schlauchsystem befindet

$V_p[t]$ Perfusatsvolumen [ml] zu einem bestimmten Zeitpunkt t [min]

$A_p[\text{min}]$ Perfusatabnahme [min]

4.2.3 Verneblung der carboxyfluoresceinhaltigen Liposomen im Vergleich zu unverkapseltem Carboxyfluorescein

Zunächst wurde die Übertrittskinetik des freien, unverkapselten Carboxyfluoresceins in das Perfusat untersucht. Es wurde geprüft, wie viel Farbstoff [ng/ml] innerhalb welcher Zeit [min] in die Elektrolytlösung übertritt. Dazu wurden vier Versuche über einen Zeitraum von fünf Stunden durchgeführt, wobei jeweils 3 ml Carboxyfluoresceinlösung mit einer Konzentration von 500 µg/ml vernebelt wurden. Die Verneblung startete jeweils mit Minute 0 und dauerte im Durchschnitt 8 Minuten. Die Untersuchung der Übertrittskinetik des Farbstoffes Carboxyfluorescein aus den Liposomenchargen DPPC:CH und DPPC:CH:SM im Vergleich mit der Verneblung des freien Farbstoffes sollte zeigen, welche Liposomen für die Einkapselung von Iloprost besser geeignet sind.

In der Abbildung 4.1 wird die CF-Konzentration [ng/ml] im Perfusatmedium am Modell der isolierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge nach Applikation von DPPC:CH- bzw. DPPC:CH:SM 2%- Liposomen sowie freiem Carboxyfluorescein mit einem Aeroneb-Piezovernebler im Verlauf von fünf Stunden dargestellt.

Die Proben sind in der ersten halben Stunde zunächst im Abstand von fünf, anschließend zehn Minuten entnommen worden. Die CF-Konzentration wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders bestimmt, wobei pro Probe jeweils drei Messungen erfolgten.

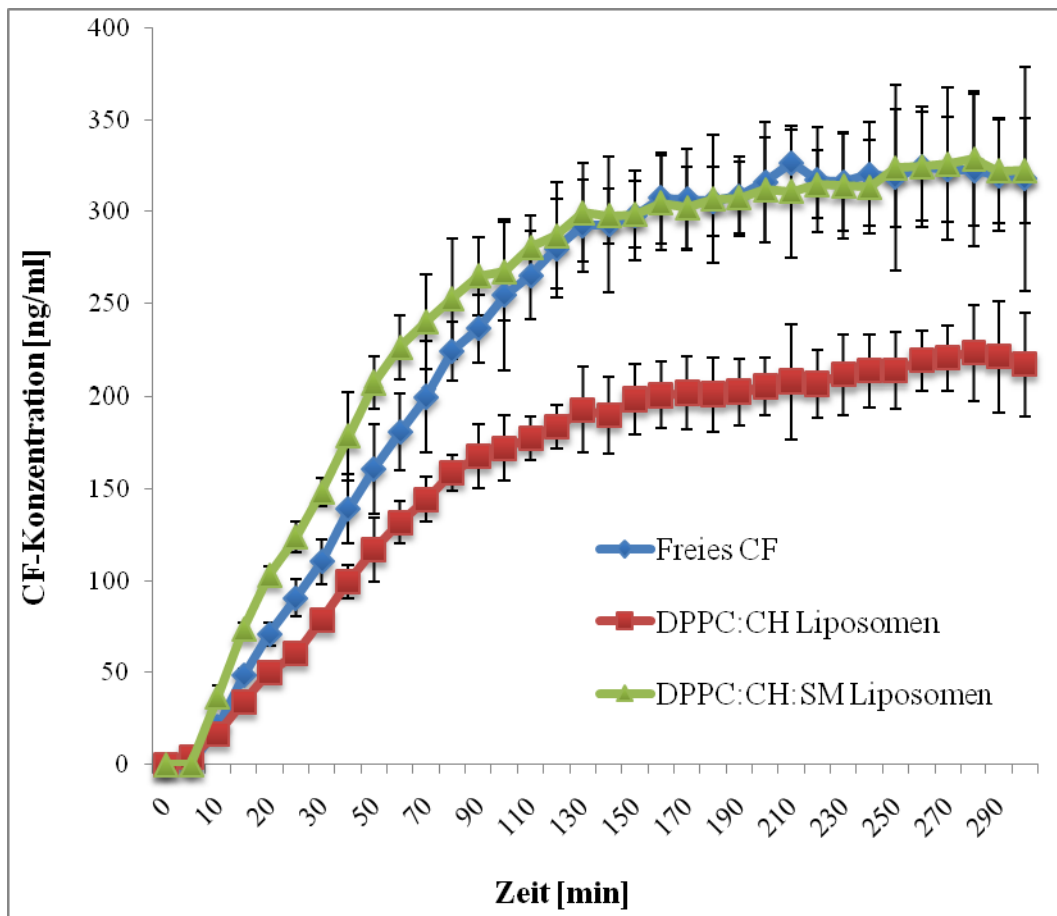


Abbildung 4.1: Übertrittskinetik von CF aus DPPC:CH und DPPC:CH:SM 2% - Liposomen im Perfusatmedium am Modell der isolierten Kaninchenlunge im Vergleich zur Übertrittskinetik von unverkapseltem CF mit einem Aeroneb-Piezovernebler (n=4); Mittelwerte mit Standardabweichung

Die Übertrittskinetiken von freiem CF und den DPPC:CH:SM 2%- Liposomen sind sehr ähnlich. Nach ca. 15 min tritt der in die Liposomen mit Sphingomyelin eingekapselte Farbstoff geringfügig schneller ins Perfusat über als der unverkapselte Farbstoff; nach ca. 200 min wird ein Plateau erreicht. Aus den DPPC:CH- Liposomen wird der Farbstoff wesentlich langsamer freigesetzt. Diese Liposomen werden aufgrund der Untersuchungsergebnisse für die Einkapselung von Iloprost in den nachfolgenden Versuchen verwendet.

4.3 Versuche mit Iloprost

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche mit freiem und in DPPC:CH-Liposomen verkapseltem Iloprost dargestellt.

4.3.1 PAP nach inhalativer Applikation von freiem Iloprost am Modell der isolierten Kaninchenlunge

Zunächst erfolgten vier Kontrollversuche mit freiem Iloprost. Dazu wurde der pulmonal-arterielle Druck am Modell der isolierten, blutfrei perfundierten Kaninchenlunge mittels Perfusor von einem physiologischen PAP von 6 bis 10 mmHg auf 22 bis 24 mmHg durch kontinuierliche Applikation von U 46619, einem Thromboxananalogon, angehoben.

Bei der Dauerinfusion mit U 46619 stieg der PAP zunächst rasch an. Die Infusionsgeschwindigkeit wurde deshalb gesenkt, bis sich schließlich ein Gleichgewicht einstellte. Die Infusion mit U 46619 in einer Konzentration von 2,5 µg/ml und mit einer Geschwindigkeit von 1,7 bis 7,9 ml/h (entspricht 4,25 bis 19,75 µg/h) erfolgte durch einen Perfusor kontinuierlich während der gesamten Versuchsdauer. Nach Erreichen des Gleichgewichts wurden 60 Minuten nach Versuchsbeginn 3 ml freie Iloprostlösung in einer Konzentration von 2,5 µg/ml mit einem Aeroneb® Professional- Piezovernebler zwei Minuten lang vernebelt. Aufgrund der Vorversuche ist bekannt, dass in 8 Minuten ca. 0,4 ml (Tabelle 4-1 Gesamtdeposition Lunge) in der Lunge deponiert werden. Dies entspricht einer Iloprostmenge von 1 µg. Daraus ergibt sich, dass im Rahmen der zweiminütigen Iloprostverneblung in die isolierte und blutfrei perfundierte Kaninchenlunge eine Gesamtmenge von 250 ng Iloprost gelangt.

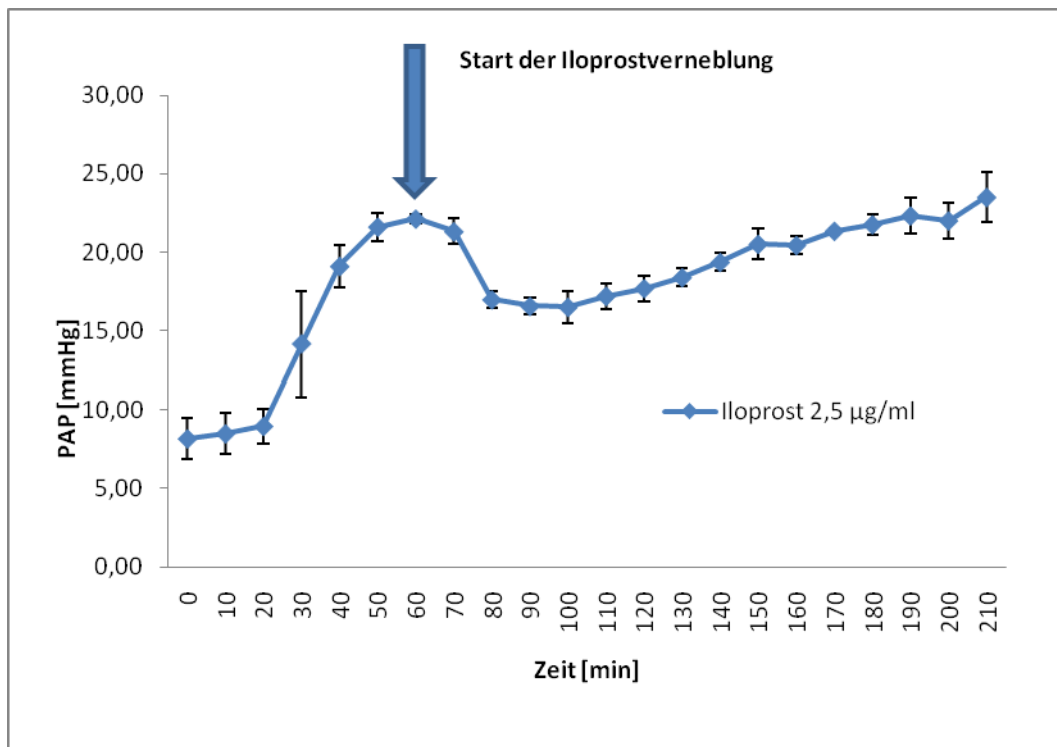


Abbildung 4.2: Verlauf des pulmonal-arteriellen Druckes nach Applikation von 2,5 µg/ml Iloprost am mit U 46619 induzierten Hypertoniemodell isolierter Kaninchenlungen (n=4); Mittelwert mit Standardabweichung

Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, die Kaninchenlungen mit Elektrolytlösung perfundiert und mit einem normoxischen Gasmisch beatmet.

4.3.2 PAP nach inhalativer Applikation von verkapseltem Iloprost im Vergleich zu unverkapseltem Iloprost

Für die Versuche mit den Iloprost-haltigen DPPC:CH-Liposomen wurden zwei Chargen hergestellt, um zu überprüfen, ob die Herstellung reproduzierbar zu ähnlichen Liposomen geführt hat. Die Verneblung von 2,5 ml iloprosthaltiger Liposomendispersion (DPPC:CH der Formulierung 7:3) erfolgte mit dem piezoelektrischen Vernebler Aeroneb® Professional in das Modell der isolierten

und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge. Sie begann jeweils dann, wenn ein konstantes Druckplateau erreicht war.

Mit Hilfe von U 46619 wurde der pulmonal-arterielle Druck im Verlauf von 110 Minuten per Dauerinfusion durch einen Perfusor auf einen Wert von 22 mmHg angehoben. Nach inhalativer Applikation der ersten Charge der liposomalen Dispersion fiel der PAP auf etwa 16 mmHg ab. Dies entspricht einer durchschnittlichen Drucksenkung von 28%. Im weiteren Versuchsverlauf stieg der pulmonal-arterielle Druck in einem Zeitraum von ca. 2,5 h langsam wieder auf das Ausgangsniveau und dann sogar weiter darüber hinaus an.

Anschließend erfolgte die Herstellung der iloprosthaltigen Liposomencharge 2 entsprechend der Liposomencharge 1. Es fanden zwei Versuche mit dieser Charge statt, die in der folgenden Abbildung 4.3 gezeigt werden.

Der Versuchsablauf erfolgte analog: Hier wurde mittels U 46619 der pulmonal-arterielle Druck auf einen Wert von durchschnittlich etwa 21 mmHg angehoben. Nach inhalativer Applikation der zweiten Charge der liposomalen Dispersion fällt der PAP auf etwa 17 mmHg ab. Dies entspricht einer durchschnittlichen Drucksenkung von 19%. Im weiteren Versuchsverlauf stieg der pulmonal-arterielle Druck in einem Zeitraum von ca. 150 Minuten langsam wieder auf das Ausgangsniveau und dann weiter darüber hinaus an.

In der Abbildung 4.3 wird die Zusammenfassung der insgesamt vier Versuche mit der Iloprostliposomencharge 1 und 2 sowie der Standardabweichung im Vergleich zu unverkapseltem Iloprost dargestellt. Gemessen wurde der PAP [mmHg] in Bezug auf die Versuchsdauer [min]. Die Verläufe des pulmonal-arteriellen Druckes (in mmHg bzw. % dargestellt) sind so übereinandergelegt worden, dass die Verneblung in allen Versuchen mit Minute 0 begann.

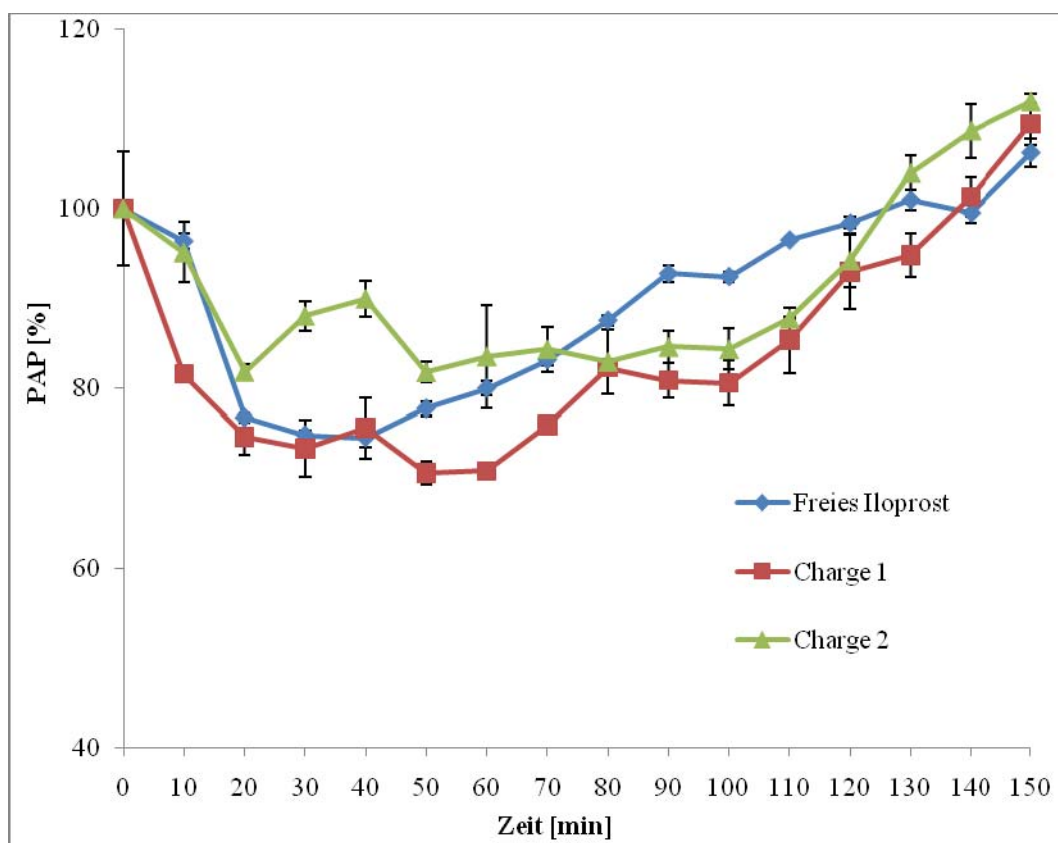


Abbildung 4.3: Zusammenfassung der Versuche zur Pharmakodynamik mit freiem Iloprost und in DPPC:CH-Liposomen verkapseltem Wirkstoff (n=4)

Der PAP ist in % dargestellt, wobei der Zeitpunkt des Beginns der Verneblung von freiem und verkapseltem Wirkstoff als PAP= 100% festgelegt wird.

5. Diskussion

5.1 Kritische Betrachtung der Methodik

In den folgenden Kapiteln werden die Verwendung des isolierten Herz-Lungen-Modells von Kaninchen, der Einsatz des Farbstoffes Carboxyfluorescein, die Verwendung von Iloprost, die Erzeugung von pulmonaler Hypertonie durch U 46619 sowie die Herstellung und Charakterisierung der Liposomenchargen diskutiert.

5.1.1 Das isolierte Herz-Lungen-Modell von Kaninchen

Das Modell der isolierten, blutfrei perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge war in dem Labor des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, in dem die Untersuchungen durchgeführt wurden, bereits etabliert und standardisiert [SEEGER et al. 1994; WEIßMANN 1994]. Vorteile sind die gute Verfügbarkeit der Versuchstiere, die relativ homogen waren in Bezug auf Alter, Geschlecht und Gewicht. Eine einheitliche Handhabung der Kaninchenlungen mit den erforderlichen physiologischen Parametern (Atemzugvolumen, Beatmungsfrequenz, endexpiratorischer Druck, Perfusion, Perfusatemperatur) war gegeben. Die Präparation der Lungen war ohne Probleme zu erlernen. Nachteilig könnten sich Erkrankungen der Versuchstiere mit klinischer Inapparenz auswirken, die zu Schädigungen, hier insbesondere des Respirationstraktes, führen und die gemessenen Parameter unerklärbar beeinflussen können. Die Messergebnisse lassen sich nicht bestimmten Lungenbestandteilen oder gar Zellen, bestimmten Abschnitten des Versuchsmodells oder der Interaktion von beiden sicher zuordnen, sondern werden durch das Gesamtorgan beeinflusst. Trotz intensiver Spülung mit Elektrolytlösung kann das Verbleiben von Leukozyten (Lymphozyten,

Granulozyten und Makrophagen) in Lungengefäßen oder an Wänden des Perfusatsystems nicht völlig ausgeschlossen werden. Ein weiterer großer Nachteil ist die zeitliche Begrenzung der Versuchsdauer. Nur sehr wenige Lungenversuche waren länger als fünf Stunden durchzuführen. Dann entwickelten sich Lungenödeme, der PAP stieg an und aus dem Organpräparat trat Perfusionslösung aus. Eine Erklärung hierfür können durch Isolation der Lunge bedingte metabolische oder biochemische Vorgänge sein. Die Isolation von Herz und Lunge bedeutet auch das Fehlen der physiologischen Innervation. Naturgemäß kann ein solches Modell nicht alle Aspekte der in der Realität vorkommenden Erkrankung widerspiegeln. Um Funktionsmessungen durchzuführen, hat es sich aber als sehr hilfreich erwiesen [SEEGER et al. 1994].

5.1.2 Verwendung von Carboxyfluorescein

Carboxyfluorescein (CF) wurde als freier Farbstoff und verkapselt in Liposomen in das isolierte Herz-Lungen-Modell von Kaninchen vernebelt. Seine Übertrittskinetik ins Perfusat konnte mit der des verkapselten Farbstoffes direkt verglichen werden. CF ist gut geeignet für die Erforschung von Wirkstofftransport durch vernebelte controlled release Formulierungen in die Lunge [WOLFFREY et al. 1986]. Als Modelldroge für die inhalative Applikation im Vergleich zu anderen Farbstoffen hat sich CF als besser geeignet erwiesen, da der Farbstoff schnell und in zum Nachweis ausreichender Menge ins Perfusat übertritt [LAHNSTEIN et al. 2008].

5.1.3 Verwendung von Iloprost

Iloprost ist als Wirkstoff für die inhalative Applikation bereits seit September 2003 durch die European Medicines Agency (EMA) für die Behandlung von idiopathischer pulmonal-arterieller Hypertonie, NYHA III, zugelassen. In der Literatur wird die gute blutdrucksenkende Wirksamkeit von inhalativem Iloprost im Lungenarteriensystem belegt [OLSCHEWSKI et al. 2007; EWERT et al.

2009]. Auch in den eigenen Untersuchungen nach Druckerhöhung mittels U 46619 waren die Drucksenkungen durch Iloprost gut reproduzierbar. Ein direkter Nachweis von Iloprost aus dem Perfusat erfolgte nicht, weil dazu sehr aufwändige und teure Messmethoden angewendet werden müssten. Diese wurden im Rahmen einer Dissertation durch SCHULZ [2001] durchgeführt. SCHULZ konnte nachweisen, dass eine Iloprost-Aerosolierung einen raschen Anstieg der Wirkstoffkonzentration im Perfusat bewirkt. Zudem wurde Iloprost bei Deposition im Alveolarraum rasch metabolisiert.

5.1.4 Pulmonale Hypertonie durch U 46619

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Versuche mit Iloprost eine pulmonale Hypertonie durch U 46619 induziert. Eine konstante pulmonale Hypertonie mit diesem Thromboxan A₂ Agonisten herzustellen ist eine bewährte Methode. Nach Absetzen von U 46619 ist die Druckerhöhung reversibel [RIMAR AND GILLIS 1993, LINDEBORG et al. 1995; WALMRATH et al. 1997]. Eingesetzt am Modell des Ganztieres-Kaninchens hat sich gezeigt, dass relevante Gasaustauschstörungen oder negative systemische Co-Reaktionen nicht zu verzeichnen waren [ENKE 2008]. In der eigenen Arbeitsgruppe wurde am Modell der isolierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge die pulmonale Druckerhöhung mittels U 46619 etabliert [SCHULZ 2001].

5.1.5 Herstellung und Charakterisierung der Liposomen

Die Auswahl der Lipide zur Herstellung der DPPC:CH- sowie der DPPC:CH:SM 2% - Liposomen erfolgte auf Basis der Erkenntnisse von WASCHKOWITZ [2002] und KLEEMANN et al. [2007]. DPPC, CH und SM sind Lipide, die für die inhalative Applikation gerne verwendet werden. Sie sind Bestandteile von Lungen-Surfactant, d.h. diese Lipide kommen bereits physiologisch in der Lunge vor [ERNST N. et al. 1999; BERNHARD W. et al. 2000; WASCHKOWITZ 2002; KLEEMANN et al. 2007].

Der Herstellungsvorgang der CF-Liposomen durch die Filmmethode [BANGHAM et al. 1965], die Extrusion und die Zentrifugation sowie die Charakterisierung erfolgte nach den im Labor üblichen standardisierten Verfahren [WASCHKOWITZ 2002; KLEEMANN et al. 2007]. Die DPPC:CH-Liposomen eignen sich gut zur Einkapselung von Wirkstoffen. Erste Untersuchungen dieser Liposomenformulierung in Bezug auf die Stabilität gegenüber Surfactant legten die gute Verwendungsmöglichkeit für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nahe [BRÜCK 1998; WASCHKOWITZ 2002; KLEEMANN 2005]. Die Liposomenherstellung mit Iloprostbeladung erfolgte analog zu den CF-haltigen Liposomen. In der Literatur wird beschrieben, dass die DPPC:CH – Liposomen mit Iloprost für die Versuche gut geeignet erscheinen. Sie haben eine höhere Verkapselungseffizienz und eine höhere Stabilität bei Verneblung als andere Liposomen [KLEEMANN et al. 2007].

Ein Ziel der eigenen Untersuchung war es daher, die drucksenkende Wirkung solcher mit Iloprost beladenen Liposomen am Modell der isolierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge bei medikamentös induzierter pulmonaler Hypertonie erstmals exakt über die Zeit zu bestimmen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Diskussion der Ergebnisse basiert auf den Arbeiten von WASCHKOWITZ [2002], KLEEMANN [2005] und KLEEMANN et al. [2007]. Die Autoren haben die in der Arbeitsgruppe etablierten Methoden und Geräte zur Herstellung und Charakterisierung der Liposomen verwendet. Auf Grundlage ihrer Ergebnisse wurden die am besten geeignet erscheinenden Liposomen ausgewählt, mit Iloprost beladen und am Modell der isolierten, blutfrei perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge vernebelt, um durch Messung des pulmonal-arteriellen Widerstandes die drucksenkende Wirkung von eingekapseltem Iloprost mit unverkapseltem Iloprost vergleichen zu können.

5.2.1 Radioaktive Versuche mit zwei Verneblungssystemen

In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmalig die Charakterisierung der zwei Verneblermodelle durch quantitative Bestimmung der in der isolierten Kaninchenlunge deponierten, radioaktiven Aerosolmenge. Die Lungendeposition ist verneblerspezifisch und essenziell für die nachfolgenden pharmakokinetischen Versuche. Faktoren wie Partikelgröße, Output des Verneblers, Atemmuster und Morphologie beeinflussen die Lungendeposition. Die in der Tabelle 4-1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich das Ultraschallverneblungssystem und der piezoelektrische Vernebler in Bezug auf halbwertszeitkorrigierte Aktivitäten von Lunge und Systembestandteilen, Gesamtdeposition, Exhalation und Depositionsfraction deutlich unterscheiden. Der durchgeführte U-Test (Mann-Whitney-Test) zeigt für die Gesamtdeposition, die Exhalation und die Depositionsfraction mit $p = 0,029$ signifikante Unterschiede.

Damit ist der piezoelektrische Aeroneb®Professional im entscheidenden Parameter der Gesamtdeposition signifikant besser geeignet für die Verneblung an der isolierten, blutfrei perfundierten Kaninchenlunge. Mit diesem Aerosolgenerator werden von einem vernebelten Milliliter NaCl-Technetium-Lösung 400 µl in der Lunge deponiert. Im Gegensatz dazu werden durch das Ultraschallverneblungssystem durchschnittlich nur 61 µl in der Lunge deponiert. Auch andere Untersuchungen zeigen, dass piezoelektrische Vernebler dem Ultraschallvernebler überlegen sind, unter anderem in Bezug auf Verneblungszeit und Lungendeposition [DHAND 2004, KLEEMANN et. al. 2007]. Dies scheint bedingt zu sein durch eine andere Technik bei der Erzeugung der Aerosole. Beim Ultraschallvernebler entstehen Vibrationen, indem durch einen Kristall mechanische Wellen erzeugt werden. Diese werden durch eine Flüssigkeit übertragen auf einen Medikamentenbecher, in dem sich die zu vernebelnde Lösung befindet [DHAND 2004; LAHNSTEIN 2009]. Beim piezoelektrischen Aeroneb®Professional Vernebler wird eine Lochplatte mit ca. 1000 Bohrungen durch Wechsellspannung in minimale Bewegung im Mikrometerbereich versetzt, durch die die zu vernebelnde Substanz in Aerosolform gebracht wird. Die

Durchführung der weiteren Versuchsreihen erfolgte aufgrund der besseren Eignung mit dem Aeroneb®Professional Vernebler der Firma Aerogen, Irland.

5.2.2 Versuche mit dem Farbstoff Carboxyfluorescein

Charakterisierung der farbstoffhaltigen Liposomen

Für die Charakterisierung der carboxyfluoresceinhaltigen Liposomen erfolgten Untersuchungen in Bezug auf Größe, Stabilität und Verkapselungseffizienz.

Größe

Die Deposition von Aerosol in der Lunge hängt von den Faktoren Impaktion, Sedimentation und Diffusion ab. Welcher der Faktoren Einfluss nimmt, wird insbesondere durch die Teilchengröße und Einatemgeschwindigkeit bestimmt. Aerosoltröpfchen im Größenbereich zwischen 1 und 5 µm sind geeignet für die erwünschte alveolare Deposition [GRONEBERG et al. 2003; BARRY et al. 1996; NEWMAN AND CLARKE 1993; STAHLHOFEN et al. 1980].

Die Tabelle 4-2 beinhaltet die Ergebnisse der Größenmessungen mit dem Laserdiffraktometer, wobei es sich um Mittelwerte aus jeweils sechs Messungen pro Probe handelt. Bei Messungen direkt nach der Extrusion waren die DPPC:CH-Liposomen durchschnittlich mit 0,87 µm kleiner als die DPPC:CH:SM-Vesikel mit 1,02 µm. Nach der Verneblung wurden die Messungen erneut durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die DPPC:CH-Liposomen mit einer Größe von 1,16 µm nur noch geringfügig kleiner waren als die DPPC:CH:SM-Vesikel mit 1,17 µm. Die Liposomen, die zusätzlich Sphingomyelin enthalten, sind somit bei Verneblung in Bezug auf die Größenmessung stabiler als die Liposomen ohne Sphingomyelin-Anteil, deren Größe durch die Aerosolierung zunahm. Nach Kenntnis der Autorin liegen bislang keine vergleichbaren Ergebnisse anderer Studien vor.

Andere Untersuchungen weisen bei Verwendung einer Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 400 nm liposomale Vesikelgrößen von 0,57 bis 0,68 µm auf [WASCHKOWITZ 2002]. Die Größenunterschiede lassen sich durch die Verwendung von anderen Verneblern bei den Untersuchungen von WASCHKOWITZ erklären. Auch WASCHKOWITZ stellte 2002 in ihren Untersuchungen fest, dass die Partikelgrößen der Liposomen nach der Verneblung geringfügig zunahmen. So waren zum Beispiel die DPPC:CH:SM Liposomen vor der Verneblung 0,68 µm und nach der Verneblung 0,70 µm groß.

Verkapselungseffizienz [%]

In der Tabelle 4-2 wird dargestellt, dass im Durchschnitt die DPPC:CH-Liposomen der Formulierung 7:3 mit 1,75 % eine etwas geringere Verkapselungseffizienz aufweisen als die DPPC:CH:SM-Liposomen (2,16%). Bei Verwendung gleicher Herstellungsmethoden und CF-Konzentrationen, aber anderer Lipidzusammensetzungen erreichte WASCHKOWITZ [2002] Verkapselungseffizienzen für die DPPC:CH-Liposomen von 2,4% und für die DPPC:CH:SM-Liposomen von 2,8%. Die geringfügig höhere Einschussrate der beiden liposomalen Zusammensetzungen bei WASCHKOWITZ [2002] konnte in der vorliegenden Arbeit nicht ganz reproduziert werden.

Der Zusatz von 2% Sphingomyelin (SM) steigerte die Verkapselungseffizienz in den eigenen Untersuchungen auf durchschnittlich 2,16%. Sphingomyelin ist strukturell dem Phosphatidylcholin ähnlich und besteht aus Cholin, Phosphorsäure, Sphingosin und einer amidartig an die Aminogruppe des Sphingosins gebundenen Fettsäure. Sphingosin ist ein ungesättigter, zweiwertiger Aminoalkohol (chem. 2-Amino-4-trans-octadecen-1,3-diol), der als Baustein der Sphingomyeline sowie anderer Lipide (Cerebroside, Ganglioside, Sulfatide) in der Natur vorkommt. Die Frage, ob die bessere Verkapselungseffizienz der DPPC:CH:SM-Liposomen auch zu größerer Stabilität gegenüber der Verneblung führte, wird nachfolgend diskutiert.

Stabilität

Die Stabilitätsuntersuchungen, die in Tabelle 4-2 zusammengefasst sind, zeigen, dass sich beide selbst hergestellten Liposomen-Formulierungen auch nach der Verneblung mit dem piezoelektrischen Vernebler als stabil erwiesen. Beide liposomalen Formulierungen waren für die inhalative Applikation geeignet. Der Anteil von verkapseltem Carboxyfluorescein betrug vor der Verneblung etwa 97% und nach der Verneblung etwa 71%. WASCHKOWITZ [2002] verglich Düsenvernebler und Ultraschallvernebler. Nach Düsenverneblung ermittelte sie etwa 70% intakte Liposomen und nach der Ultraschallverneblung lediglich 33%. In einer anderen Veröffentlichung wurden DPPC:CH- mit DPPC:CH:PEG verglichen in Bezug auf die Stabilität nach Verneblung durch Düsen-, Ultraschall- und Mikropumpenvernebler. Dabei stellte sich heraus, dass die DPPC:CH-Liposomen am stabilsten waren [KLEEMANN 2005]. Für die eigenen Versuche wurden zunächst die DPPC:CH-Liposomen und die DPPC:CH:SM-Liposomen verwendet. Erst nach den Verneblungsversuchen mit dem Farbstoff Carboxyfluorescein an der isolierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge zeigte sich, dass die DPPC:CH - Liposomendispersionen für die nachfolgenden Versuche mit Iloprost besser geeignet waren.

Verneblung von Carboxyfluorescein in das isolierte Herz-Lungen-Modell

Die Abbildung 4-1 zeigt u.a. die Konzentration von freiem Carboxyfluorescein als Mittelwert mit Standardabweichung im Perfusat am Modell der isolierten Kaninchenlunge. Die Applikation von 3 ml (500 µg/ml) CF erfolgte mit einem Aeronex-Piezovernebler (n=4). Zehn Minuten nach Beginn der Verneblung von Carboxyfluoresceinlösung zeigte sich ein Anstieg des Farbstoffgehaltes im Perfusat. Nach 160 Minuten wurde ein Plateauwert von etwa 315 ng/ml CF in der Elektrolytlösung erreicht. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer anderen Untersuchung erzielt, in der die Freisetzungskinetik von unverkapseltem Carboxyfluorescein [240 µg/ml] verglichen wurde mit der Freisetzungskinetik

von verkapseltem CF [WASCHKOWITZ 2002]. Die Ergebnisse der Verneblung von freiem CF wurden als Basis für die Liposomenversuche benötigt.

Verneblung der farbstoffhaltigen Liposomen

In der Abbildung 4-1 wurde die Übertrittskinetik von Carboxyfluorescein aus DPPC:CH und DPPC:CH:SM 2% - Liposomen im Perfusatmedium am Modell der isolierten Kaninchenlunge im Vergleich zur Übertrittskinetik von unverkapseltem CF dargestellt. Die Versuche mit freiem CF und mit den DPPC:CH:SM-Liposomen führten zu einem linearen und nahezu identischen Anstieg der CF-Konzentration im Perfusat. Nach 160 Minuten wurde ein Plateauwert von etwa 320 ng/ml CF in der Elektrolytlösung erreicht. Hingegen wurde aus den DPPC:CH-Liposomen der Farbstoff verzögert freigesetzt. Die im Perfusat gemessenen CF-Konzentrationen der DPPC:CH (7:3)-Liposomen erreichten einen Plateauwert von etwa 210 ng/ml. Da lediglich ein sehr geringfügiger Unterschied der Konzentrationen von freiem CF im Vergleich zu in DPPC:CH:SM-Liposomen verkapseltem CF gezeigt werden konnte, wurden für die weiteren Versuche die DPPC:CH-Liposomen verwendet. Diese waren besser geeignet, weil aus ihnen der Farbstoff langsamer abgegeben wurde. Die Erklärung dafür scheint zu sein, dass Liposomen mit dem Zusatz Sphingomyelin weniger stabil bei der Verneblung in die isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Kaninchenlunge sind. In einer anderen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass bei Steigerung des Anteils von Sphingomyelin von 3% auf 6 %, die Liposomen zu stabil werden und kaum noch Farbstoff freisetzen nach Verneblung in eine Kaninchenlunge [WASCHKOWITZ, 2002].

5.2.3 Versuche mit Iloprost

Die DPPC:CH-Liposomen-Dispersionen wurden für die folgenden pharmakodynamischen Versuche mit Iloprost am Modell der isolierten Kaninchenlunge verwendet, bei denen der PAP [mmHg] gemessen wurde.

Verneblung von freiem Iloprost

Im Unterschied zu den Versuchsreihen mit dem Farbstoff Carboxyfluorescein wurde das Modell der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge modifiziert, indem mit dem Thromboxananalogen U 46619 ein pulmonaler Hochdruck von etwa 22 mmHg erzeugt wurde. Per Dauerinfusion mit Hilfe eines Perfusors konnte der pulmonale Druck konstant gehalten werden. In Abbildung 4-2 wird dargestellt, dass der PAP nach inhalativer Applikation von 250 ng Gesamtdeposition Iloprost auf etwa 17 mmHg gesenkt werden konnte. Dies entsprach einer durchschnittlichen Drucksenkung von 23%. Im Verlauf der ca. 180 Minuten dauernden Versuche stieg der pulmonal-arterielle Druck in einem Zeitraum von ungefähr zwei Stunden langsam wieder auf das Ausgangsniveau an. Die Erkenntnisse in Bezug auf die Verneblung von freiem Iloprost entsprechen auch zuvor gemachten Versuchen mit verschiedenen Ausgangskonzentrationen, wobei die alveoläre Deposition im Bereich von 75 ng, 300 ng und 900 ng gewählt wurde. Die drucksenkende Wirkung von Iloprost trat unmittelbar nach dem Start der Inhalation ein. Durch Deposition von 75 ng konnte eine Drucksenkung von 29% erreicht werden, wobei ein Wirkstoffspiegel von ca. 130 pg/ml gemessen werden konnte. Eine Reduktion des PAP um 28% konnte durch Deposition von 300 ng erreicht werden mit einem Wirkstoffspiegel von ca. 460 pg/ml. Indem 900 ng Iloprost durch inhalative Applikation verabreicht wurden, konnte der PAP um 45 % gesenkt werden bei einem durchschnittlichen Wirkstoffspiegel von ca. 1000 ng/ml. Die Dauer der Drucksenkung war bei Deposition von 300 ng mit durchschnittlich 60-90 Minuten am längsten und am kürzesten (30 Minuten) bei der Verabreichung von 900 ng [SCHULZ, 2001].

Verneblung von iloprosthaltigen Liposomen

Erstmalig wurde in der vorliegenden Arbeit in Liposomen verkapseltes Iloprost in das Modell der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge vernebelt mit dem Ziel, eine länger andauernde Drucksenkung zu erzielen. Abbildung 4-3 zeigt, dass durch Verneblung des freien Iloprost und der iloprosthaltigen Liposomen der pulmonal-arterielle Druck innerhalb von 20 Minuten nach Verneblung um Werte zwischen 19% und 28% gesenkt werden konnte. Innerhalb der nächsten zwei Stunden stieg der PAP wieder langsam an bis auf das Ausgangsniveau und darüber hinaus. Durch die Einkapselung von Iloprost in DPPC:CH-Liposomen der Formulierung 7:3 wurde keine länger anhaltende Gesamtdauer der Drucksenkung im Vergleich zu freiem Iloprost erreicht.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein liposomales Carriersystem für die inhalative Applikation von Iloprost herzustellen und daraufhin zu prüfen, ob es den Wirkstoff verzögert freigibt. Für Patienten, die an pulmonaler Hypertonie erkrankt sind und die das Medikament bislang 6 bis 12 Mal täglich inhalieren müssen, wäre ein Gewinn an Lebensqualität zu erzielen, wenn sich eine Depotwirkung mit der Einkapselung in Liposomen erzielen ließe. Unverkapseltes Iloprost führt zu einer relativ kurz andauernden selektiven pulmonalen Vasodilatation von 30 bis 90 Minuten [OLSCHEWSKI et al. 1999; WALMRATH et al. 1997; OLSCHESKI et al. 2000; GALIÈ et al. 2004; HOEPER et al. 2002].

Zunächst wurde erstmalig eine radioaktive Charakterisierung von zwei Verneblertypen durchgeführt, die ergab, dass der piezoelektrische Vernebler Aeroneb®Professional gegenüber dem Ultraschallvernebler Optineb® in Bezug auf Gesamtdeposition in der Lunge, Exhalation und Depositionsfraction signifikant besser geeignet war für die weiteren Versuche.

Mit dem Aeroneb®Professional wurde an der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge die Übertrittskinetik von freiem, unverkapseltem Carboxyfluorescein in das Perfusat untersucht und das Konzentrations-Zeit-Profil erstellt. Der Hauptteil der eigenen Untersuchungen bestand in der Herstellung und Charakterisierung der liposomalen Carriersysteme für die inhalative Applikation von Carboxyfluorescein und Iloprost. Die Liposomendispersionen wurden am Modell der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge vernebelt.

In den Versuchen mit CF erwiesen sich die DPPC:CH-Liposomen ohne Sphingomyelin als geeigneter für die weiteren Versuche mit dem Wirkstoff Iloprost. Die DPPC:CH:SM-Liposomen unterschieden sich in ihrer Freisetzungskinetik nicht von den Ergebnissen der Verneblung von freiem CF. Deshalb sind sie für die weiteren Versuchsreihen nicht eingesetzt worden.

Des weiteren erfolgten Untersuchungen zur Pharmakodynamik nach Verneblung von freiem Iloprost im Vergleich zu in DPPC:CH-Liposomen verkapseltem Iloprost am Modell der pulmonal-arteriellen Hypertonie mittels U 46619. Es wurde deutlich, dass die DPPC:CH-Liposomen als Retardformulierung für Iloprost nicht geeignet sind, da sich kein signifikanter Unterschied zu den pharmakodynamischen Daten der Verneblung von freiem Iloprost feststellen ließ.

Durch Einsatz von Liposomendispersionen anderer Zusammensetzungen sollte künftig weiter erprobt werden, ob die erforderliche Depot-Wirkung nicht doch durch Verkapselung zu erzielen ist.

7. Summary

The aim of this work was to produce a liposomal carrier system for the inhalative application of iloprost and then to examine if the active ingredient had a delayed release. For patients suffering from pulmonary arterial hypertension and that inhalation 6 – 12 times per day need, it would lead to an improvement in quality of life if the encapsulation in liposomes could produce a residual effect. Non encapsulated iloprost has a relatively short-lived effect of selective pulmonary vasodilatation lasting 30 to 90 minutes [OLSCHEWSKI et al. 1999; WALMRATH et al. 1997; OLSCHESKI et al. 2000; GALIÈ et al. 2004; HOEPER et al. 2002].

At first a radioactive characterization of two types of nebulizers was performed, which showed that the piezoelectric nebulizer Aeroneb®Professional compared to the ultrasonic nebulizer Optineb® in relation to the total deposition in the lung, exhalation and deposition fraction was significantly better suited for the further experiments.

Using the Aeroneb®Professional on the isolated, ventilated and perfused rabbit lung, the transfer kinetic of non-encapsulated carboxyfluorescein in the perfusate was measured and the concentration-time-profile was created.

The main component of the investigations consisted of the production and characterization of the liposomal carrier systems for the inhalative application of carboxyfluorescein and iloprost. The liposomes dispersions were nebulized on the model of the isolated, ventilated and perfused rabbit lung

The tests with carboxyfluorescein proved that the DPPC:CH-liposomes without sphingomyelin were more suitable for the further experiments with the active ingredient iloprost. The DPPC:CH:SM-liposomes did not differ in their release kinetics from the results of the nebulization of non-encapsulated carboxyfluorescein. Therefore, they were not used in the further trials.

Further examination of the pharmacodynamics after nebulization of non-encapsulated iloprost compared to the iloprost loaded DPPC:CH-liposome was performed on a model with pulmonary arterial hypertension using U 46619. It became clear that the DPPC:CH-liposomes were not suitable as retarded formulation for iloprost, as no significant difference in the pharmacodynamic data of the nebulization of non-encapsulated iloprost could be established.

The use of other compositions of liposomes dispersions should be tested to see if a residual effect through encapsulation still possible is.

Literaturverzeichnis

- Bangham AD.**, Physical structure and behavior of lipids and lipid enzymes. *Adv Lipid Res.* 1963; 1: 65-104.
- Bangham AD.**, Lipid bilayers and biomembranes. *Annu Rev Biochem.* 1972; 41: 753-776.
- Bangham AD, Dingle JT, Lucy JA.**, Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 9. Penetration of lipid monolayers by compounds in the vitamin A series. *Biochem J.* 1964; 90(1): 133-140.
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC.**, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965; 13(1): 238-252.
- Barry PW and O'Callaghan C.**, Inhalational drug delivery from seven different spacer devices. *Thorax.* 1996; 51(8): 835-840.
- Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaine S.**, Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43(12): 40-47.
- Behr J, Borst MM, Winkler J, Hoepfer M, Halank M, Ghofrani A, Klose H, Wilkens H, Stähler G.**, A role for combination therapy in pulmonary arterial hypertension. *Pneumologie.* 2005; 59(10): 730-735.
- Bernhard W, Mottaghian J, Gebert A, Rau GA, von der Hardt H, Poets CF.**, Commercial versus native surfactants. Surface activity, molecular components, and the effect of calcium. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162 (4): 1524-1533.
- Brück A.**, Lektinfunktionalisierte Liposomen zur alveolaren Absorption makromolekularer Arzneistoffe. Inaugural-Dissertation. Universität Saarbrücken. 1998.
- Chen YF, Oparil S.**, Endothelial dysfunction in the pulmonary vascular bed. *Am J Med Sci.* 2000; 320(4): 223-232.
- Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE.**, An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1992; 327(2): 70-75.
- D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, Levy PS, Pietra GG, Reid LM, Reeves JT, Rich S, Vreim CE, Williams GW, Wu M.**, Survival in patients with primary pulmonary hypertension: results from a national prospective registry. *Ann Intern Med.* 1991; 115(5): 343-349

- Dhand.,** Basic techniques for aerosol delivery during mechanical ventilation. *Respir Care*. 2000; 49(6): 611-622.
- Enke B.,** Einfluss von Phosphodiesteraseinhibition auf die gefäßerweiternde Wirkung von inhalativem Prostazyklin in einem experimentellen Modell der akuten pulmonalen Hypertonie. Inauguraldissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen. 2008.
- Ernst N, Ulrichskotter S, Schmalix WA, Gersting S, Plank C, Reinhardt D, Roseacker J.,** Interaction of liposomal and polycationic transfection complexes with pulmonary surfactant. *J Gene Med* 1999; 1 (5): 331-340.
- Ewert R, Schäper C, Halank M, Gläser S, Opitz CF.,** Inhalative iloprost – pharmacology and clinical application. *Expert Opin Pharmacother*. 2009; 10(13):2195-207
- Fritze A.,** Präparation und Charakterisierung von Liposomen zum passiven und aktiven Targeting. Inaugural-Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. 2005.
- Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL.,** Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation*. 1984; 70(4): 580-587.
- Gainé SP, Rubin LJ.,** Primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 1998; 352(9129): 719-725.
- Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G; Sildenafil Use in Pulmonary Arterial Hypertension (SUPER) Study Group.,** Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2005; 353(20): 2148-2157.
- Galiè N, Manes A, Branzi A.,** Prostanoids for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Med*. 2003; 2(2): 123-137.
- Galiè N, Seeger W, Naeije R, Simonneau G, Rubin LJ.,** Comparative analysis of clinical trials and evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43(12): 81-88
- Galiè N, Torbicki A, Barst R, Dartevelle P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin LJ, Simonneau G, Priori SG, Gracia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Burgos EF, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, McGregor K, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Barbera JA, Gibbs S, Hoeper M, Humbert M, Naeije R, Pepke-Zaba J, Task Force.,** Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2004; 25(24): 2243-2278.

- Gessler T.**, Entwicklung und Charakterisierung eines geschlossenen und effizienten Ultraschall-Aerosolgenerators. Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen. 1999
- Gessler T, Seeger W, Schmehl T.**, Inhaled prostanoids in the therapy of pulmonary hypertension. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2008; 21(1): 1-12.
- Giaid A, Saleh D.**, Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1995; 333(4): 214-221.
- Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ.**, Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1993; 328(24): 1732-1739.
- Gregoriadis G.**, Drug entrapment in liposomes. *FEBS Lett.* 1973; 36(3): 292-296.
- Gregoriadis G.**, The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). *N Engl J Med.* 1976; 295(13): 704-710.
- Gregoriadis G.**, The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *N Engl J Med.* 1976; 295(14): 765-770.
- Gregoriadis G, Buckland RA.**, Enzyme-containing liposomes alleviate a model for storage disease. *Nature.* 1973; 244(5412): 170-172.
- Gregoriadis G, Ryman BE.**, Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem J.* 1971; 124(5): 58-62
- Grit M, de Smidt JH, Struijke A & Crommelin DJA.**, Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *Int J Pharm.* 1989; 50:1-6.
- Groneberg DA, Witt C, Wagner U, Chung KF, Fischer A.**, Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respir Med.* 2003; 97 (4): 382-387
- Hoeper MM, Galiè N, Simonneau G, Rubin LJ.**, New treatments for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165(9): 1209-1216.
- Huang C.**, Studies of phosphatidylcholine vesicles. Formation und physical characteristics. *Biochemistry.* 1969; 8(1): 344-352.
- Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW.**, Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1977; 470(2): 185-201.
- Kähler CM.**, Combination therapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Dtsch Med Wochenschr.* 2009; 134(5): 181-182
- Keck CM, Müller RH.**, Moderne pharmazeutische Technologie. Onlinelehrbuch. www.pharmazie-lehrbuch.de; Kap. 3.1 Laserdiffraktometrie

- Kirchengast M, Luz M.**, Endothelin receptor antagonists: clinical realities and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005; 45(2): 182-191.
- Kleemann E.**, Polyethylenimine- an lipid- based nanoparticles as gene and drug delivery system of aerosol therapy to the lung. Dissertation 2005.
- Kleemann E., Schmehl T., Gessler T., Bakowsky U., Kissel T., Seeger W.**, Iloprost-containing liposomes for aerosol applikation in pulmonary arterial hypertension: formulation aspects and stabiliy. *Pharmaceutical Research* 2007; 24(2):277-287
- Lahnstein K, Schmehl T, Rüsch U, Rieger M, Seeger W, Gessler T.**, Pulmonary absorption of aerosolized fluorescent markers in the isolated rabbit lung. *Int J Pharm.* 2008; 351(1-2): 158-164.
- Langleben D.**, Familial primary pulmonary hypertension. *Chest.* 1994; 105(2): 13-16.
- Lasic DD, Frederik PM, Stuart MC, Barenholz Y, McIntosh TJ.**, Gelation of liposome interior. A novel method for drug encapsulation. *FEBS Lett.* 1992; 312(3): 255-258.
- Lindeborg DM, Kavanagh BP, Van Meurs K, Pearl RG.**, Inhaled nitric oxide does not alter the longitudinal distribution of pulmonary vascular resistance. *J Appl Physiol.* 1995; 78(1): 341-348.
- Lloyd JE, Primm RK, Newman JH.**, Familial primary pulmonary hypertension: clinical patterns. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 129(1): 194-197.
- Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR.**, Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 858(1): 161-168.
- MacDonald RC, MacDonald RI, Menco BP, Takeshita K, Subbarao NK, Hu LR.**, Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1061(2): 297-303.
- Mereles D, Ehlken N, Kreuscher S, Ghofrani S, Hoeper MM, Halank M, Meyer FJ, Karger G, Buss J, Juenger J, Holzapfel N, Optiz C, Winkler J, Herth FF, Wilkens H, Katus HA, Olschewski H, Grünig E.**, Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation.* 2006; 114(14): 1482-1489.
- Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, Archer S.**, Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation.* 2002; 105(20): 2398-2403.
- New RRC.**, Liposomes: A practical approach. Oxford University Press 1990. ISBN: 0-19-963077-1
- Newman SP and Clarke SW.**, Therapeutic aerosols. 1 physical and practical considerations. *Thorax.* 1983; 38(12): 881-886

- Olschewski H, Seeger W, Grimminger F.**, Physiologie und pathophysiologie der pulmonalen Zirkulation. Internist. 1999(b);40:696-709.
- Olschewski H, Ghofrani HA, Schmehl T, Winkler J, Wilkens H, Höper MM, Behr J, Kleber FX, Seeger W.**, Inhaled iloprost to treat severe pulmonary hypertension. An uncontrolled trial. German PPH Study Group. Ann Intern Med. 2000; 132(6): 435-443.
- Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoeper MM, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani HA, Manes A, Kiely DG, Ewert R, Meyer A, Corris PA, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H, Seeger W, Aerosolized Iloprost Randomized Study Group.**, Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. N Engl J Med. 2002; 347(5): 322-329.
- Olschewski H.**, Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. Dtsch Med Wochenschr. 2006; 131(12): 635-638
- Olschewski H, Hoeper MM, Borst MM, Ewert R, Grünig E, Kleber F-X, Kopp B, Opitz C, Reichenberger F, Schmeisser A, Schranz D, Schulze-Neick, I, Wilkens H, Winkler J, Worth H.**, Diagnostik und Therapie der chronischen pulmonalen Hypertonie. Clin Res Cardiol 2007; 96: 301-330.
- Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D.**, Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. Biochim Biophys Acta. 1979; 557(1): 9-23.
- Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergowsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, Levy PC, Vreim CE, Williams GW.**, Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. Ann Intern Med. 1987; 107(2): 216-223.
- Rich S, Kaufmann E, Levy PS.**, The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1992; 327(2): 76-81.
- Rimar S, Gillis CN.**, Selective pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide is due to haemoglobin inactivation. Circulation. 1993; 88(6): 2884-2887.
- Rubin LJ.**, Primary pulmonary hypertension. Chest. 1993; 104(1): 236-250.
- Rubin LJ.**, Therapy of pulmonary hypertension: the evolution from vasodilators to antiproliferative agents. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166(10): 1308-1309.
- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G.**, Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. N Engl J Med. 2002; 346(12): 896-903.
- Sastry BK, Narasimhan C, Reddy NK, Raju BS.**, Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-

- controlled, double-blind, crossover study. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43(7): 1149-1153.
- Schubert R.**, Liposomen in Arzneimitteln. In: *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen 2. überarbeitete und erweiterte Auflage.* Müller RH u. Hildebrandt GE (Hrsg.). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1998. Kap. 21: 219-242
- Seeger W, Walmrath D, Grimminger F, Rosseau S, Schütte H, Krämer HJ, Ermert L, Kiss L.**, Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 549-584.
- Sessa G, Weissmann G.**, Incorporation of lysozyme into liposomes. A model for structure-linked latency. *J Biol Chem.* 1970; 245(13): 3295-3301
- Sharma P, Tyrrell DA, Ryman BE.**, Some properties of liposomes of different sizes [proceedings]. *Biochem Soc Trans.* 1977; 5(4): 1146-1149.
- Simonneau G, Galiè N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A.**, Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43(12): 5-12
- Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, Gracia G, Parent F, Hervé P, Simonneau G.**, Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2005; 111(23): 3105-3111.
- Stahlhofen W, Gebhart J, Heyder J.**, Experimental determination of the regional deposition of aerosol particles in the human respiratory tract. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1980; 41(6): 385-398a.
- Szoka F Jr, Papahadjopoulos D.**, Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1980; 9: 467-508.
- Torchilin VP and Weissig V.**, *Liposomes-Second Edition: A Practical Approach* Oxford University Press, Oxford 2003.
- Tuder RM, Cool CD, Yeager M, Taraseviciene-Stewart L, Bull TM, Voelkel NF.**, The pathobiology of pulmonary hypertension: endothelium. *Clin Chest Med.* 2001; 22(3): 405-418.
- Walmrath D, Schermuly R, Pilch J, Grimminger F, Seeger W.**, Effects of inhaled versus intravenous vasodilators in experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 1997; 10(5): 1084-1092.
- Waschkowitz E.**, Darstellung und Charakterisierung einer liposomalen Depotform zur inhalativen pulmonalen Applikation. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität Giessen. 2002.
- Weinstein JN.**, Liposomes as drug carriers in cancer therapy. *Cancer Treat Rep.* 1984; 68(1): 127-135

- Weißmann N.**, Die hypoxische Vasokonstriktion isolierter, artifiziell perfundierter und ventilierter Kaninchenlungen. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen. 1994.
- Woolfrey SG, Taylor G, Kellaway IW, Smith A.**, Pulmonary absorption of carboxyfluorescein in the rat. *J Pharm Pharmacol.* 1986; 38(4): 304-306.
- Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV Jr, Gaine SP, Orens JB, Rubin LJ.**, Dysfunctional voltage-gated K⁺channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation.* 1998; 98(14): 1400-1406.

Anhang

Tabelle A 1: Chemikalien, Lösungen und Lösungsmittel

Substanz	Abkürzung/Konzentration Summenformel	Hersteller
Acetatpuffer Essigsäure Natriumacetat	pH 4,7 C ₂ H ₄ O ₂ 0,1 mol 6,0g C ₂ H ₃ NaO ₂ 0,1mol 8,2g gelöst in 1l H ₂ O	Merck, Darmstadt, D Merck, Darmstadt, D
Apua ad injectabilia		Baxter, Unterschleißheim, D
Braunol®	7,5% Lösung zur Anwendung auf der Haut	Braunoderm, Melsungen, D
5(6)-Carboxy-fluorescein	CF	Fa. Fluka, Buchs, CH
Chloroform	CHCl ₃ ; 119,38 g/mol	Merck, Darmstadt, D
Chlorwasserstoff	HCL 1 M	Merck, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
9,11-Dideoxy-11α,9α- Epoxythano-Prostaglandin- F_{2α}	U46619	Sigma, Deisenhofen, D
Heparin	100 I.E./kg	Roche, Grenzach, Wyhlen, Ch
Iloprost	Ilomedin® 20 μ g/ml	Schering, Berlin, D
Isopropylalkohol	CH ₃ CH(OH)CH ₃ ; 60,10 g/mol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	KCl,	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄ ; 174,18 g/mol	Merck, Darmstadt, D
Ketaminhydrochlorid	Ketavet®	Pharmacia, Erlangen, D
Krebs-Henseleit-Puffer	Elektrolytlösung II N	Serag-Wiessner, Naila, D
Krebs-Henseleit-Puffer	Elektrolytlösung 1/3	Serag-Wiessner, Naila, D
Lidocainhydrochlorid	Xylocain® 2%	AstraZeneca, Wedel, D
Methanol	CH ₃ OH; 32,04 g/mol	Merck, Darmstadt, D

Natriumchlorid	NaCl	Karl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃ 8,4%	Braun, Melsungen, D
Natriumhydroxid	NaOH 10 M	Merck, Darmstadt, D
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS pH 7,4 80,0 g NaCl 2,00 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 2,00 g KH ₂ PO ₄	
Physiologische Lösung	NaCl 0,9%	Braun, Melsungen, D
Technetium	99m-Tc [11,1-15,7 MBq]	
Triton® X-100		Merck, Darmstadt, D
Xylacinhydrochlorid	Rompun® 2%	Bayer, Leverkusen, D

Tabelle A 2: Perfusatzusammensetzungen (Krebs-Henseleit-Lösung)

Perfusat	Hersteller, Zusammensetzung
Elektrolytlösung 1/3	Serag-Wiessner, Naila, D 125 mM NaCl 4,3 mM KCl 1,1 mM KH ₂ PO ₄ 2,4 mM CaCl ₂ 1,3 mM MgCl ₂ 13,32 mM Glucose
Elektrolytlösung IIN	Serag-Wiessner, Naila, D 120 mM NaCl 4,3 mM KCl 1,1 mM KH ₂ PO ₄ 2,4 mM CaCl ₂ 1,3 mM MgCl ₂ 13,32 mM Glucose 50g/l Hydroxyethylstärke (MG 200.000)

Tabelle A 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aerosolfilter	Iso-Gard Filters, USA
DC Alufolien, Schichtdicke 0,2 mm	Merck, Darmstadt, D
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einmalspritzen	Braun, Melsungen, D
Filter, Pall Cardioplegia Plus 0,2 µm	Pall Biomedical Corp., Fajardo, USA
Einmalhandschuhe	Sensi Clean Ansell, Brüssel, Belgien
Injektionsstopfen Nr. 891.01	Wygon, Aachen, D
Mikrotiterplatten	Costar Assay Plate 96 Well, USA
Mundschutz	Standard Face Mask, Göteborg, Schweden
Nahtmaterial	Nadel mit Faden, Mersilene 4, 1 SH, Ethicon, Norderstedt, D
Polycarbonatmembranfilter 0,4µm	Avestin, Mannheim, D
Schläuche (Tygon, Kalensee)	Tygon, Gießen, D
Schläuche PVC	Sorin Biomedica, Düsseldorf, D
Silikonspray	Centramed, Koblenz, D
Tupfer	Schlinggazettupfer, Fuhrmann, Much, D
Venenpunktionsbesteck	Butterfly Eloflo, Gelnhausen, d

Tabelle A 4: Überblick über alle verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Beatmungspumpe, Cat/Rabbit Ventilator	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D
Druckumwandler, elektromechanisch	Combitans, Braun, Melsungen, D
Fluoreszenzreader	Fluorescence plate reader, Bio-Tek FL600, USA
Gefäße	Rundkolben 250 ml und 500 ml mit Glasverschluß, Büchi Labortechnik AG, Flawil, CH
Gewichtsregistrierer	Rikadenki R 50 Series, Rikadenki Electronics, Freiburg, D
Glasspritzen	Hamiltonspritzen, 1 ml und 0,5 ml, Fa. Hamilton, Bonaduz, CH
Laserdiffraktometer	Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, D
LiposoFast Extruder	Avestin, Ottawa, CA
Liposomenextrusion	Polycarbonatfilter 400 nm Porengröße, Fa. Nuclepore, Tübingen, D
Magnetrührer/Heizplatte	Typ 162C, Mercateo, Köthen
Messverstärker, Plugsys DBA 660	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D
Peristaltikpumpe, Roller Pump BP 742	Fresenius, Bad Homburg, D
pH-Meter	
Piezoelektrischer Vernebler	Aeroneb®Professional, Aerogen, Irland
Rotationsverdampfer, Rotavapor-M	Büchi Labortechnik, Flawil, CH
Schreiber, Rikadenki R 50 Series	Rikadenki Electronics, Freiburg, D
Systemkühlung Frigomix BU	Braun, Melsungen, D
Thermostat Thermomix BU	Braun, Melsungen, D
Ultraschallvernebler Optineb®	Nebutech, Elsenfeld, D
Vakuumtrockenschrank	Fa. Salvis
Waage	Biotrog, Fa. Riegler und Kirstein, Wiesbaden, D
Wägezelle	Wägezelle Typ U1, Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, D
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, D

Tabelle A 5: Überblick über die Lipide, die zur Liposomenherstellung verwendet wurden

Bezeichnung	Abkürzung	Herkunft
Cholesterol	CH	Sigma Aldrich, Taufkirchen, BRD
1,2 Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine	DPPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster Alabama, USA
Sphingomyelin	SM	Avanti Polar Lipids, Alabaster Alabama, USA

Tabelle A 6: Überblick über die verwendeten liposomalen Formulierungen

Lipide	Verhältnis (mol/mol)
DPPC : CH	7 : 3
DPPC : CH + SM	7 : 3 + 2%

Tabelle A 7: Überblick über die Zusammensetzungen der Eichreihen

Eichreihe	CF-Konzentration [ng/ml]	[CF 50µg/ml] Stammlösung [µl]	PBS [ml]	Elektrolytlösung 1/3 [ml]	Triton [ml]
PBS	2000	400	9,6		
	1000	200	9,8		
	500	100	9,9		
	250	50	9,95		
	100	20	9,98		
	10	2	9,998		
	1	0,2	9,9998		
Elektrolytlösung	2000	400	0,6	9	
	1000	200	0,8	9	
	500	100	0,9	9	
	250	50	0,95	9	
	100	20	0,98	9	
	10	2	0,998	9	
	1	0,2	0,9998	9	
Triton	2000	400	0,6		9
	1000	200	0,8		9
	500	100	0,9		9
	250	50	0,95		9
	100	20	0,98		9
	10	2	0,998		9
	1	0,2	0,9998		9

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.1:

Übertrittskinetik von CF aus DPPC:CH und DPPC:CH:SM 2% - Liposomen im Perfusatmedium am Modell der isolierten Kaninchenlunge im Vergleich zur Übertrittskinetik von unverkapseltem CF mit einem AERONEB-Piezovernebler (n=4); Mittelwerte mit Standardabweichung.....38

Abbildung 4.2:

Verlauf des pulmonal-arteriellen Druckes nach Applikation von 2,5 µg/ml Iloprost am mit U 46619 induzierten Hypertoniemodell isolierter Kaninchenlungen (n=4); Mittelwert mit Standardabweichung40

Abbildung 4.3:

Zusammenfassung der Versuche zur Pharmakodynamik mit freiem Iloprost und in DPPC:CH-Liposomen verkapseltem Wirkstoff (n=4).....42

Tabellenverzeichnis

Tabellen im Text

Tabelle 3-1: Lipidmengen für die Herstellung des Lipidfilms	25
Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der radioaktiven Charakterisierung der Verneblungssysteme Optineb® und Aeroneb® Professional (n=4).....	33
Tabelle.4-2: Charakterisierung der mit Carboxyfluorescein (CF) beladenen DPPC:CH - Liposomen und der DPPC:CH:SM 2% - Liposomen in den eingesetzten Dispersionen.....	35

Tabellen im Anhang

Tabelle A 1: Chemikalien, Lösungen und Lösungsmittel	65
Tabelle A 2: Perfusatzusammensetzungen (Krebs-Henseleit-Lösung)	66
Tabelle A 3: Verbrauchsmaterialien	67
Tabelle A 4: Überblick über alle verwendeten Geräte	68
Tabelle A 5: Überblick über die Lipide, die zur Liposomenherstellung verwendet wurden	69
Tabelle A 6: Überblick über die verwendeten liposomalen Formulierungen.....	69
Tabelle A 7: Überblick über die Zusammensetzungen der Eichreihen	70

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AGPHT	Arbeitsgemeinschaft Pulmonale Hypertonie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie und der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz und Kreislaufforschung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	Carboxyfluorescein
°C	Grad Celsius
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CH	Cholesterol
Cps	counts per second
DPPC	Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
EE	Einschlusseffizienz
EMA	Europäische Arzneimittelagentur (European Medicines Agency)
eNOs	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase
ER	Einschlussrate
ERA	Endothelinrezeptorantagonist
ESC	European Society of Cardiology
FPAH	Familiäre pulmonal- arterielle Hypertonie
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
g	Gramm
GUV	Sehr großes unilamellares Vesikel (giant unilamellar vesicle)
³ H	Tritium
h	Stunde
HDCAA	Hochdosierte Calciumantagonisten
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)

H ₂ O	Wasser
IPAH	Idiopathisch pulmonal-arterielle Hypertonie
i.v.	intravenös
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
l	Liter
LUV	Großes unilamellares Vesikel (large unilamellar vesicle)
LVP	Linksventrikulärer Druck (left ventricular pressure)
M	Molar (mol/l)
mg	Milligramm
MLV	Multi lamellares Vesikel (multi lamellar vesicle)
MMAD	Mass Median Aerodynamic Diameter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3 (N-Morpholino)-Propansulfonsäure
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NN	Normal Null
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PAP	Pulmonal-arterieller Druck (pulmonary artery pressure)
PBS	Phosphatgepufferte Saline ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (phosphate buffered saline)
PDE5I	Phosphodiesterase-5-Inhibitor

PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck (positive endexpiratory pressure)
PGI ₂	Prostazyklin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
PH	Pulmonale Hypertonie
PL	Phospholipid
PPH	Primäre Pulmonale Hypertonie
RCT	Randomisierte Studie
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RV decomp	Rechtsventrikuläre Dekompensation
RZB	Relative Zentrifugationsbeschleunigung
s.c.	subcutan
SEM	standard error of mean
SM	Sphingomyelin
SPH	Sekundäre pulmonale Hypertonie
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SUV	Kleines unilamellares Vesikel (small unilamellar vesicle)
t	Zeit
^{99m} Tc	Technetium
t _{1/2}	Halbwertszeit
Tc	Phasenübergangstemperatur
U 46619	Thromboxananalogon
VE	Verkapselungseffizienz

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Werner Seeger sowie den beiden Arbeitsgruppenleitern Dr. Thomas Schmehl und Dr. Tobias Gessler sehr für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, in dieser Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem PD Dr. Kerstin Fey für ihre Hilfe bei der Fertigstellung meiner Dissertation.

Ich danke meiner Familie für ihre Hilfe.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Ute Rüsch

Gießen, Juni 2010

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5630-8

